

Zur Analytik
des Lindenblütenöls
und der Senföle

von Hugo Nufer

1965.

Zur Analytik des Lindenblütenöls und der Senföle

**Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Ludwig-Maximilians-Universität
zu München**

**vorgelegt
von
Hugo Nufer
aus
Kempten**

August 1965



Berichterstatter: Professor Dr. L. H ö r h a m m e r

Tag der mündlichen Prüfung: 24.11.1965

I N H A L T S Ü B E R S I C H T

	Seite
E I N L E I T U N G	1
A L L G E M E I N E R T E I L	2
A. Bisherige Kenntnisse über das ätherische Öl von Flores Tiliae	2
B. Isolierung und Voruntersuchung des ätherischen Öls	2
C. Fraktionierung und Untersuchung der Fraktionen des ätherischen Öls	5
I. Untersuchung der Säurefraktion	5
II. Untersuchung der Terpenkohlenwasserstoff-Fraktion	15
III. Untersuchung der Fraktion der Carbonylverbindungen	36
1. Abtrennung der Carbonylverbindungen	36
2. Gaschromatographische Untersuchung der Carbonylverbindungen	38
3. Trennung der Carbonylverbindungen in eine Aldehyd- und eine Ketonfraktion	39
4. Untersuchung der Carbonsäure-Fraktion	40
5. Isolierung und Identifizierung der Hauptspezies der Aldehyd-Fraktion	43
6. Untersuchung der Ketonfraktion	47
IV. Untersuchung der Fraktion der primären Alkohole	51
1. Abtrennung der primären Alkohole	51
2. Gaschromatographie der primären Alkohole	52
3. Säulenchromatographische Trennung der primären Alkohole	54
4. Untersuchung der primären Alkohol-Fraktion auf Farnesol	54
V. Untersuchung der Ester-Fraktion	56
1. Abtrennung der Ester	56
2. Untersuchung der Esterfraktion auf Farnesol	56
3. Isolierung und Identifizierung des Esters E1	56
VI. Untersuchung der Fraktion der tertiären Alkohole	60
1. Dünnschichtchromatographie der 3,5-Dinitrobenzozate (DNE)	60

2. Gaschromatographische Untersuchung	62
3. Säulenchromatographische Fraktionierung der 3, 5-Dinitrobenzoate an Kieselgel	64
4. Untersuchung der Fraktion 4 mit 5	64
6. Untersuchung der Fraktion 11 mit 15	65
7. Untersuchung der Fraktion 21 mit 32	67
8. Untersuchung der Fraktion 42 mit 50	69

EXPERIMENTELLER TEIL (Lindenblütenöl) 70

I. Chromatographische Untersuchungen	70
1. Dünnschicht- und Papierchromatographie	70
2. Säulenchromatographie	71
3. Gaschromatographie	71
II. Physikalisch-chemische Untersuchungen	73
III. Reinigung und Absolutierung der Lösungsmittel . . .	74
IV. Gewinnung des ätherischen Öls	75
V. Gruppenanalyse des ätherischen Öls	75
VI. Untersuchung der Säurefraktion	76
1. Abtrennung der Säuren	76
2. Methylierung der Säuren	77
3. Säurehydroxamate	77
4. Gaschromatographie	78
5. Isolierung der Säuren	78
VII. Untersuchung der Terpenkohlenwasserstoff-Fraktion .	81
1. Abtrennung der Terpenkohlenwasserstoffe	81
2. Reinigung der Terpenkohlenwasserstoffe über Harn- stoff-Addukte	82
4. Chromatographische Untersuchungen	83
5. Herkunft und Herstellung der Vergleichssubstanzen	86
6. Isolierung von p-Cymol	89
7. Isolierung des Terpenkohlenwasserstoffes Peak 7 .	90
VIII. Untersuchung der Fraktion der Carbonylverbindungen .	91
1. Abtrennung der Carbonylverbindungen	91
2. Trennung der Carbonylverbindungen in eine Aldehyd- und eine Ketonfraktion	91
3. Isolierung von Cuminaldehyd	92
4. Chromatographische Untersuchungen	95

5. Herstellung der 2,4-Dinitrophanylhydrazone von Ketonen	97
6. Trennung der Keton-2,4-Dinitrophenylhydrazone . . .	97
7. Isolierung eines Keton-2,4-Dinitrophenylhydrazons .	98
8. Chromatographische Untersuchungen	98
IX. Untersuchung der primären Alkohole	100
1. Abtrennung der primären Alkohole	100
2. Gaschromatographische Untersuchung	101
3. Säulenchromatographische Trennung der Alkohol-3,5-Dinitrobenzoate	103
4. Untersuchung der Alkohol-Fraktion auf Farnesol . .	104
X. Untersuchung der Ester	107
1. Abtrennung der Ester	107
2. Nachweis von Farnesol	107
3. Isolierung von 2-Äthylhexanolacetat	108
4. Identifizierung des 2-Äthylhexanolacetats	109
5. Dünnschichtchromatographische Überprüfung	114
6. Gaschromatographische Überprüfung	115
XI. Untersuchung der tertiären Alkohole	118
1. Herstellung der 3,5-Dinitrobenzoate	118
2. Fraktionierung der 3,5-Dinitrobenzoate	118
3. Untersuchung der Fraktion 4 bis 5	119
4. Untersuchung der Fraktion 11 bis 15	119
5. Untersuchung der Fraktion 21 bis 32	121
6. Dünnschichtchromatographische Untersuchungen . .	123
7. Gaschromatographische Untersuchungen	125
8. Herkunft und Herstellung der Testsubstanzen . . .	127
A L L G E M E I N E R T E I L	128
Dünnschichtchromatographie von Senfölen und Senfölglykosen	128
Identifizierungs- und quantitative Bestimmungsmethoden für Senföle	130
1. Quantitative Bestimmungsmethoden	130
2. Bisherige chromatographische Methoden zum Nachweis der Senföle und ihrer Glukoside	131
3. Neue Untersuchungen	132

EXPERIMENTELLER TEIL	145
1. Untersuchung der freien Senföle	145
2. Untersuchung der Senfölglykoside	148
3. Herstellung der Testsubstanzen	149
LITERATUR	150-151

E I N L E I T U N G

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit zwei Teilproblemen der Analyse von ätherischen Ölen: 1. die Mikroanalyse eines kompliziert zusammengesetzten ätherischen Öls natürlicher Herkunft und 2. die Auftrennung solcher schwefelhaltiger flüchtiger Verbindungen, für die es bisher keine brauchbare Methode gab.

Die erste Aufgabe sollte am Beispiel des L i n d e n b l ü - t e n ö l s unter Einsatz aller heute verfügbaren modernen und klassischen Methoden durchgeführt werden. Besonderes Augenmerk sollte darauf gerichtet sein, kombinierte, gut reproduzierbare Verfahren zu schaffen, die dann als Standard und Modell für alle Untersuchungen ähnlicher Problemstellung dienen könnten.

Die zweite Aufgabe betraf die chromatographische Analyse von S e n f ö l e n und ihrer Glykoside. Hier war anzustreben, daß die wichtigsten Senföle nicht nur in pflanzlichen Auszügen, sondern auch in pharmazeutischen Präparaten schnell und einwandfrei nachweisbar sind und identifiziert werden können.

ALLGEMEINER TEIL

A. Bisherige Kenntnisse über das ätherische Öl von Flores Tiliae

WINCKLER¹⁾ gewann das ätherische Öl durch Wasserdampfdestillation frischer Blüten in einer Ausbeute von 0.038%. Durch Extraktion frischer und getrockneter Lindenblüten mit Petroläther erhielt IGOLEN²⁾ 0.33% und 0.915% "konkrete" Öle. Aus diesen wurden mit Ausbeuten von 32% und 19% die "absoluten" Öle erhalten. Wasserdampfdestillation der "absoluten" Öle ergab 5.7% ätherisches Öl. Für dieses Öl fand IGOLEN²⁾ folgende Konstanten:

$$d_{15}^{\circ} 0.913, [\alpha]_D^{28} -3^{\circ}20, n_D^{20} 1.4736, SZ 44.8, EZ 112.22$$

EZ nach Actlg. 163.9

Über die Zusammensetzung des Öls berichteten bisher nur HAARMANN und REIMER³⁾. Nach ihren Angaben soll im Lindenblütenöl Farnesol enthalten sein.

B. Isolierung und Voruntersuchung des ätherischen Öls

Zur Gewinnung des ätherischen Öls unterwarfen wir eine 2 Monate alte Schnittdroge DAB 6, die sich bekanntlich aus den Blüten von *Tilia platyphyllos* Scop. und *Tilia cordata* Mill. zusammensetzt, einer Wasserdampfdestillation. Wir erhielten bei der Probedestillation eine ätherische Ölausbeute von 0.02%. Dieser Wert stimmte mit den Ergebnissen von BRÜCKNER⁴⁾ überein. Das braungelbe, etwas viskose Öl besaß in großer Verdünnung einen an Lindenblüten erinnernden Geruch und wies folgende Konstanten auf:

$$d_{20}^{\circ} 0.921, [\alpha]_D^{20} -3^{\circ}50, n_D^{20} 1.4781, SZ 43.0, EZ 110.99$$

Diese stimmten weitgehend mit den von IGOLEN erhaltenen Werten überein.

Wie aus den chemischen Konstanten hervorgeht, enthält das ätherische Öl eine beträchtliche Menge an Säuren, Estern und Alkoholen.

Durch Dünnschichtchromatographie an Kieselgel konnten wir mit Hexan als Fließmittel Terpenkohlenwasserstoffe nachweisen. Bei Verwendung von Benzol/Chloroform 1:1 als Laufmittel und 2,4-Dinitrophenylhydrazin als Anfärbemittel erhielten wir Hinweise auf das Vorliegen von Carbonylverbindungen.

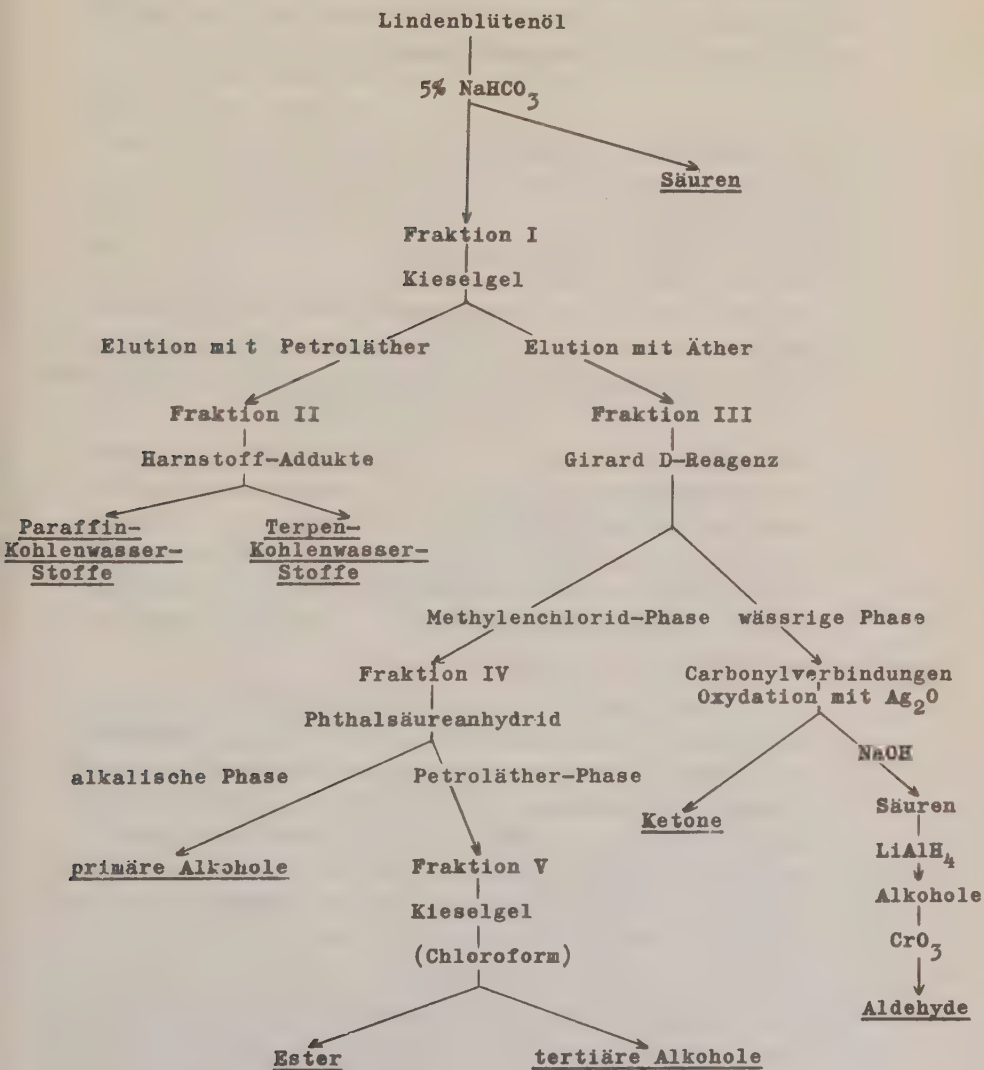
Die dünn-schicht- und gaschromatographische Analyse des Lindenblütenöls zeigte, daß es sich bei diesem Öl um ein äußerst kompliziert zusammengesetztes Gemisch handelte.

Die klassische Methode, das ätherische Öl destillativ zu fraktionieren, war im vorliegenden Falle, wegen der geringen Ölausbeuten unmöglich. Auch eine adsorptionschromatographische Auftrennung des ätherischen Öls nach Polaritätsgruppen⁵⁾ versprach in diesem Falle wenig Erfolg, da auch Fraktionen des Lindenblütenöls noch komplizierte gaschromatographisch nicht zu identifizierende Gemische darstellten. Deshalb legten wir bei der Fraktionierung des ätherischen Öls unser Hauptgewicht auf eine Ausscheidung von Stoffen gleicher funktioneller Gruppen mit chemischen Methoden. Nur in den Fällen, in denen die Chromatographie Fraktionen mit Stoffen gleicher funktioneller Gruppen lieferte, benutzten wir die chromatographischen Methoden.

In ähnlicher Weise wurde die Fraktionierung und nachfolgende gaschromatographische Analyse verschiedener Bergamotte- und Citronenöle von BAYER⁶⁾, sowie LIBERTI und CARTONI⁷⁾ vorgenommen. Die Bestandteile mit funktionellen Gruppen (Alkohole, Aldehyde, Ketone, Säuren) wurden hier durch Umsetzung mit Dinitrobenzoylchlorid bzw. Benzoylchlorid, Dinitrophenylhydrazin bzw. Semicarbazid und Natriumhydrogencarbonat dem Gemisch entzogen. Die Umsetzungsprodukte konnten getrennt untersucht und die verbleibenden flüchtigen Substanzen in Form

S c h e m a 1

Fraktionierung des Lindenblütenöls



von Differenzchromatogrammen analysiert werden. Bei der Fraktionierung des Lindenblütenöls (siehe Schema 1) verwendeten wir solche Reagenzien, deren Derivate eine leichte Abtrennung vom nicht umgesetzten Öl und eine schonende, mit guten Ausbeuten verlaufende Regenerierung der zugrundeliegenden Komponenten gewährleisteten.

C. Fraktionierung und Untersuchung der Fraktionen des ätherischen Öls

I. Untersuchung der Säurefraktion

Aus einer Lösung von 20 g Lindenblütenöl in 200 ml Petroläther erhielten wir durch Ausschütteln mit wässriger Natriumbikarbonatlösung und Ansäuern der alkalischen Phase 1.5 g eines braunen stark riechenden Öles.

Wir chromatographierten die Säuren des Lindenblütenöls in Form ihrer Hydroxamate, zunächst nach der von THOMPSON⁸⁾ angegebenen Methode im System Amylalkohol/Eisessig/Wasser 4:1:5. Die Hydroxamsäuren lagen ungetrennt bei einem R_F -Wert von 0.95. Somit war mit der Anwesenheit von Säuren mit einer Kohlenstoffzahl unter 6 nicht zu rechnen.

Zur weiteren papierchromatographischen Untersuchung der Hydroxamate chromatographierten wir diese nach MICHEEL und SCHWEPPE⁹⁾ auf acetyliertem Papier mit Äthylacetat/Tetrahydrofuran/Wasser 12:70:94 als Fließmittel. Wir erhielten bei einem R_F -Wert von 0.35 einen Hauptfleck. Schwächere Flecken erschienen bei den R_F -Werten 0.43 und 0.28. Beim Auftragen größerer Substanzmengen konnte ein weiterer Fleck bei einem R_F -Wert von 0.53 nachgewiesen werden.

Nach der Lage der R_F -Werte dürfte es sich bei den Säuren des Lindenblütenöls um Fettsäuren mit einer Kohlenstoff-

anzahl von C_7 bis C_{10} handeln. Wir verglichen sie deshalb mit den Hydroxamaten von Oenanth-, Capryl-, Pelargon- und Caprinsäure. Der Hauptfleck bei 0.35 entsprach dem Pelargonsäure-Hydroxamat. Caprylsäure und Caprinsäure-Hydroxamat stimmten mit den Flecken bei den R_F -Werten von 0.28 und 0.43 überein. Die Substanz mit dem R_F -Wert von 0.53 lag auf der gleichen Höhe wie Oenanthsäure-Hydroxamat.

Zur gaschromatographischen Trennung und Identifizierung der Säuremethylester benutzten wir eine polare Polyesterphase (Reoplex 400) und eine unpolare Phase (Apiezon L.). Als dritte Trennflüssigkeit diente Dinonylphthalat, eine stationäre Phase mittlerer Polarität^{*)}.

In den folgenden Abbildungen 1,2,3 sind die Gaschromatogramme der Säurefraktion des Lindenblütenöls an den drei stationären Phasen dargestellt.

^{*)} Zur Fettsäuremethylester-Trennung verwendet man heute anstelle der wenig polaren Apiezonfette, Squalan und Silikonöle die von CRAIG¹⁰⁾ geschaffenen polaren Polyester, wie z.B. Reoplex, LAC. Es hat sich aber eingebürgert, bei einer Identifizierung von Fettsäureestern neben der Trennung an Polyesterphasen parallel auch eine Trennung an Apiezon durchzuführen.

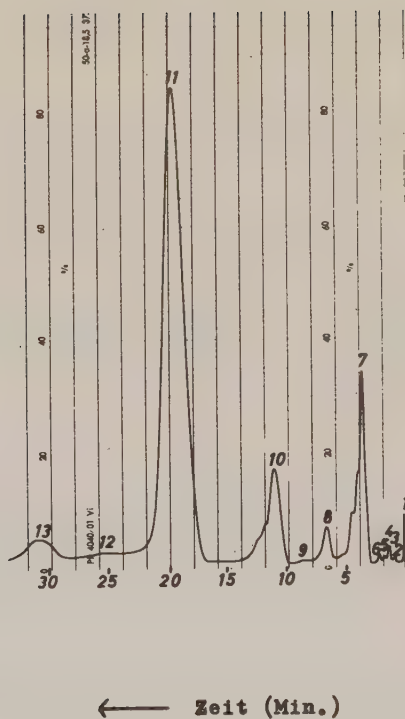
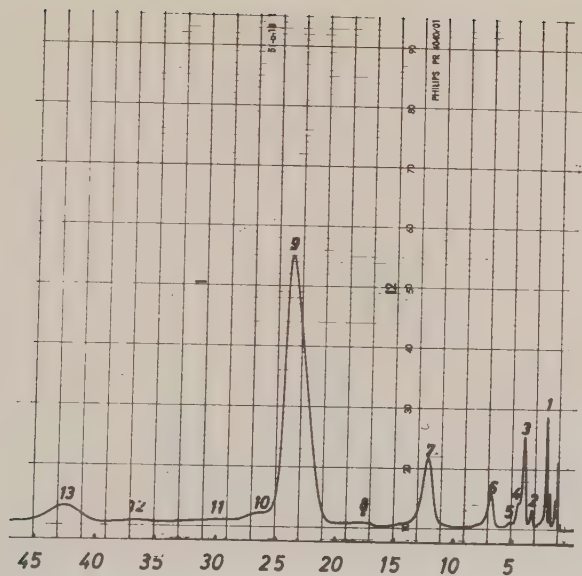


Abb. 1

Gaschromatogramm der Säurefraktion

Säule: 3 m x 4 mm, Reoplex 400 auf Chromosorb WS (45-60 mesh) 20%
Temperatur: 125°



← Zeit (Min.)

Abb. 2

Gaschromatogramm der Säurefraktion

Säule: 1.2 m x 4 mm, Apiezon L auf Sterchamol (0.1-0.2 mm) 20% + 3%

Natriumcapronat

Temperatur: 125°C

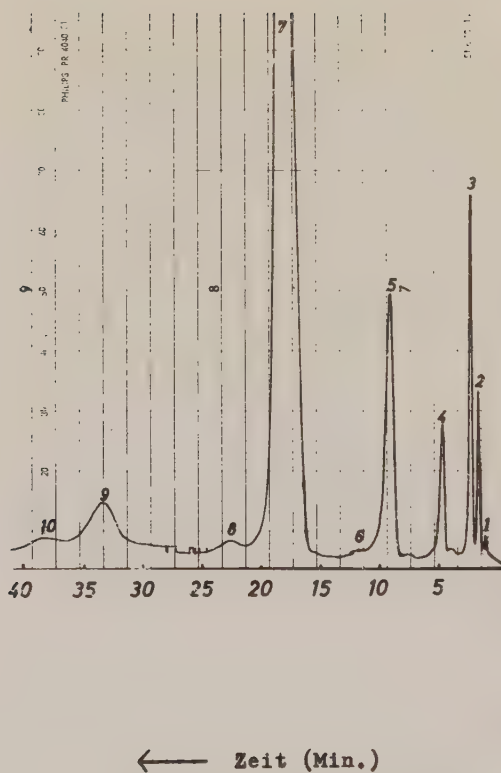


Abb. 3

Gaschromatogramm der Säurefraktion

Säule: 2 m x 4 mm, Dinonylphthalat auf Sterchamol (0.1-0.2 mm)
 Temperatur: 125° 20%

Wir nummerierten durchlaufend die Hauptsatzbanden der Chromatogramme für jede Säule und bestimmten die relativen Retentionsvolumina, bezogen auf Caprylsäuremethylester (Tab. 1).

T a b e l l e 1

Relative Retentionsvolumina, bezogen auf Caprylsäuremethylester ($\times 10^3$)

Apiezon L		Dinonylphthalat		Reoplex 400	
Peak	V _{rel}	Peak	V _{rel}	Peak	V _{rel}
1	146	1	119	1	59
2	207	2	226	2	84
3	268 Capron-s.	3	286 Capron-s.	3	134
4	305	4	560 Oenanth-s.	4	176
5	366	5	1000 Capryl-s.	5	303
6	537 Oenanth-s.	6	1262	6	336
7	1000 Capryl-s.	7	2000 Pelargon-s.	7	387 Capron-s.
8	1537	8	2357	8	622 Oenanth-s.
9	1976 Pelargon-s.	9	3500 Caprin-s.	9	807
10	2244	10	3976	10	1000 Capryl-s.
11	2707			11	1639 Pelargon-s.
12	3171			12	2134
13	3659 Caprin-s.			13	2403 Caprin-s.

Bei den Identifizierungsmaßnahmen bezogen wir uns auf das Gaschromatogramm der Reoplex-Säule (Abb.1, S.7). Da die papierchromatographischen Ergebnisse die Anwesenheit der geradkettigen Fettsäuren von C₇ bis C₁₀ wahrscheinlich gemacht hatten, verglichen wir die Retentionsvolumina dieser Säuren mit denen des Lindenblütenöls. In allen drei Gaschromatogrammen waren diese Säuren nachweisbar.

P e l a r g o n s ä u r e entsprach dem Hauptpeak der drei Gaschromatogramme und war identisch mit Peak 11 (Reoplex), Peak 7 (Dinonylphthalat) bzw. Peak 9 (Apiezon L). C a p r y l s ä u r e zeigte Identität mit Peak 10 der Reoplex-Säule. Auf der Dinonylphthalat- bzw. Apiezon-Säule lieferte diese Säure den Peak 5 bzw. Peak 7. O e n a n t h s ä u r e wurde auf der Reoplex-Säule durch den Peak 8 wiedergegeben.

Sie fand sich auf Dinonylphthalat bzw. Apiezon L als Peak 4 bzw. Peak 6. Die C a p r i n s ä u r e war den Substanzbanden 13 (Reoplex, Apiezon L) und 9 (Dinonylphthalat) zuzuordnen. Peak 7 hatte das Retentionsvolumen der C a p r o n s ä u r e und stimmte mit dieser überein. Die übrigen Substanzbanden konnten wir nicht identifizieren, da sie nicht auf allen Säulen in Erscheinung traten.

Zur I s o l i e r u n g der auf papier- und gaschromatographischem Wege identifizierten Säuren überführten wir das Säuregemisch in die p-Phenylphenacyl-ester und trennten das Estergemisch an einer Kieselgel-Säule. Diese chromatographische Methode, die zuerst von KIRCHNER und Mitarb.¹¹⁾ beschrieben wurde, eignet sich gut zur Gewinnung kleiner Fettsäuremengen. Die Phenacyl-ester können aus den Alkalisalzen der entsprechenden Fettsäuren in guten Ausbeuten erhalten werden, zeigen ein gutes Kristallisationsvermögen und sind leicht durch Umkristallisieren zu reinigen. Im langwelligen UV-Licht fluoreszieren die Phenacylate blau, so daß der Trennungsverlauf an der Säule gut zu verfolgen ist. Die Trennung der homologen geradkettigen Fettsäuren ist bis zu einer Kohlenstoffzahl von 10 zufriedenstellend.

Das Überführen des Säuregemisches des Lindenblütenöls in die entsprechenden p-Phenylphenacylate erfolgte nach den Angaben von DRAKE und BRONITSKY¹²⁾.

Das aus der Säurefraktion des Lindenblütenöls erhaltene rohe Estergemisch wurde zunächst an einer kleinen Kieselgel-Säule von störenden Verunreinigungen befreit und die

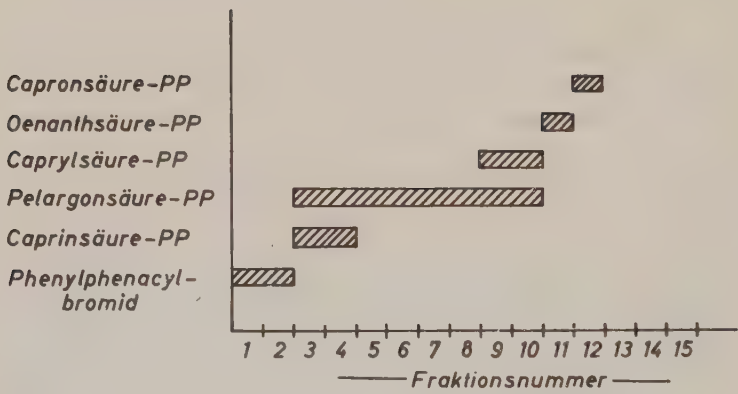
vorgereinigten Phenylphenacylate an einer zweiten Kieselgel-Säule mit dem Elutionsmittel Benzin (Sp 80-90°)/Benzol 1:1 aufgetrennt. Wir fraktionierten die deutlich blau fluoreszierende Zone in 15 Fraktionen zu je 20 ml. Den Fraktionierungsverlauf überprüften wir dünnschichtchromatographisch an mit Undecan imprägnierten Kieselgel-Platten im System Dimethylformamid/Methanol/Wasser 4:1:1 (siehe Tab. 2).

Wie aus der Tabelle 2 hervorgeht, enthielten die beiden ersten Fraktionen nicht umgesetztes p-Phenylphenacylat. Die 3. und 4. Fraktion bestand aus einem Gemisch zweier Stoffe, die mit Caprinsäure- und Pelargonsäure-phenacylat identisch waren. Die Fraktionen 5 mit 8 ergaben nach Umkristallisieren eine Substanz vom Schmelzpunkt 70 - 71°C. Der Mischschmelzpunkt mit authentischem Pelargonsäure-phenacylat ergab keine Depression. Hiermit stimmten die CH-Werte und IR-Spektren überein (Abb.4, S.14). Die folgenden Fraktionen stellten dünnschichtchromatographisch ein Gemisch von Pelargonsäure- und Caprylsäurephenacylat dar. Die 11. Fraktion war dünnschichtchromatographisch einheitlich und lieferte eine Substanz vom Schmelzpunkt 62°C. Das IR-Überlagerungsspektrum mit authentischem Oenanthesäurephenacylat zeigte völlige Übereinstimmung (Abb.5, S.14). Die Fraktion 12 enthielt nur Spuren eines Säurephenacylates, das dünnschichtchromatographisch mit dem der Capronsäure identisch war. Die 3 folgenden Fraktionen waren leer.

Der Versuch, aus dem Gemisch der 3. und 4. Fraktion das Caprinsäurephenacylat in reiner Form zu erhalten, scheiterte an Substanzmangel. Aus der 9. und 10. Fraktion konnten wir durch Rechromatographie an Kieselgel eine Substanz vom Schmelzpunkt 65°C erhalten, die im Mischschmelzpunkt den CH-Werten und dem IR-Spektrum mit authentischem Caprylsäurephenacylat übereinstimmte (Abb.6, S.14). In Tabelle 3, S. 15, liegt eine Formelübersicht der p-Phenylphenacylate der isolierten Säuren vor.

T a b e l l e 2

Chromatographische Fraktionierung der Säurephenylphenacylate (PP)
an Kieselgel



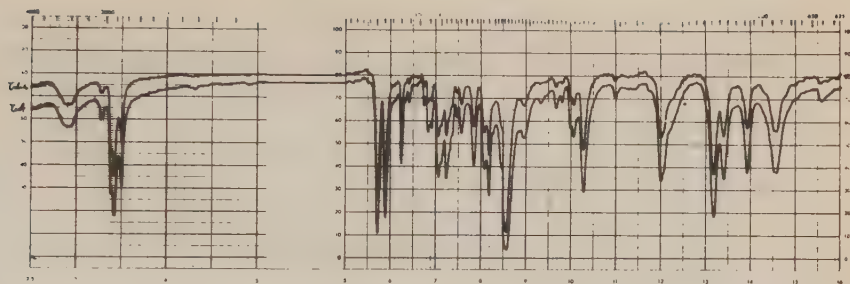


Abb. 4

IR-Überlagerungsspektrum von isoliertem und authentischem
Oenanthsäurephenacylat

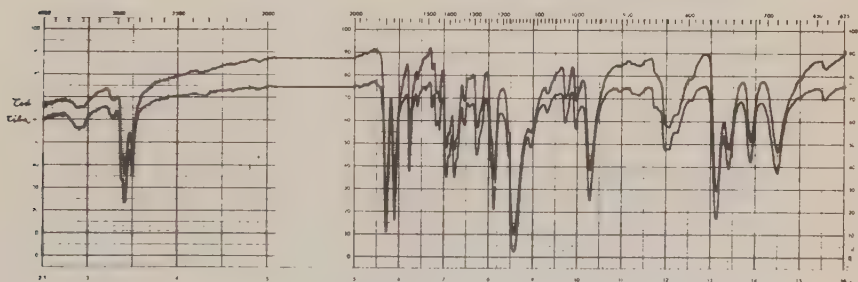


Abb. 5

IR-Überlagerungsspektrum von isoliertem und authentischem
Pelargonsäurephenacylat

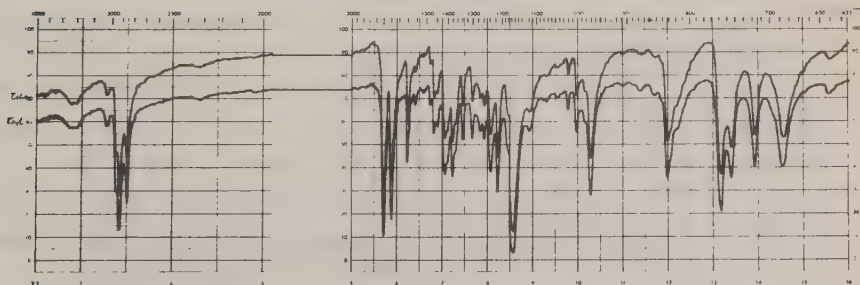


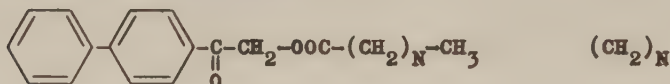
Abb. 6

IR-Überlagerungsspektrum von isoliertem und authentischem
Caprylsäurephenacylat

T a b e l l e 3

Formelübersicht der p-Phenylphenacrylate (PP) der isolierten Säuren

Säure-PP der Grundformel



Capronsäure	4
Oenanthsäure	5
Caprylsäure	6
Pelargonsäure	7
Caprinsäure	8

II. Untersuchung der Terpenkohlenwasserstoff-Fraktion

Die Terpenkohlenwasserstoffe wurden erstmals von MILLER und KIRCHNER¹³⁾ an hochaktiven Kieselgel-Schichten mit unpolaren Laufmitteln aufgetrennt.

Da sich die DK-Werte^{*)} der Terpenkohlenwasserstoffe (2.24 - 2.70) sowohl untereinander als auch von den Fließmitteln nur wenig unterscheiden, ist ihre Trennung nicht zufriedenstellend. Auch die Chromatographie der Terpenkohlenwasserstoffe in Form ihrer Quecksilber-Addukte bringt keine Vorteile¹⁴⁾. Bessere Trennergebnisse dürften mit Silbernitrat imprägnierte Kieselgel-Schichten liefern, die in neuerer Zeit zur Trennung von Sesquiterpenkohlenwasserstoffen¹⁵⁾ und 2,4-Dinitrophenylhydrazonen von Carbonylverbindungen¹⁶⁾ benutzt wurden.

Zur orientierenden dünn schicht chromatographischen Untersuchung der Kohlenwasserstoffe benutzten wir normal aktivierte Kieselgel-Platten mit Hexan als Fließmittel. Als Bezugssubstanz diente Guajazulen

*) Die Dielektrizitätskonstante (DK-Wert) einer Substanz gibt einen Anhaltspunkt für ihre Adsorptionsaffinität.

(R_f -Wert 0.33). Zum Sichtbarmachen der Kohlenwasserstoffe verwendeten wir Osmiumtetroxid-Dampf und Vanillin-Schwefelsäure (Abb. 7 und Tabelle 4).

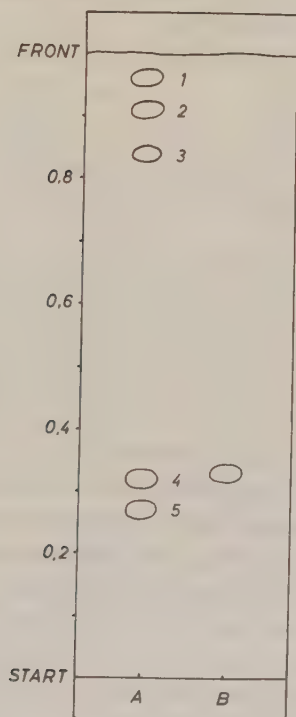


Abb. 7

Schema des Dünnschichtchromatogramms der Terpenkohlenwasserstoffe des Lindenblütenöls

A = Terpenkohlenwasserstoffe des Lindenblütenöls

B = Guajazulen

T a b e l l e 4

Erläuterungen zu Abb. 7, S.16

Substanz	R_f -Wert	OsO_4	Farbe Vanillin H_2SO_4	Farbe UV
1	0.96	+	grau-grün	-
2	0.91	+	grau-grün	-
3	0.84	-	lila	-
4	0.32	-	grau	blau
5	0.27	-	grau	grün

Mit Osmiumtetroxid konnten wir zwei Flecke mit den R_f -Werten 0.96 ($R_{Guajazulen}$ -Wert 2.89) und 0.91 (R_G -Wert 2.73) nachweisen. Mit Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz ergaben diese Flecken eine grau-grüne Färbung. Zusätzlich wurde bei dieser Anfärbung bei R_f -Wert 0.84 (R_G -Wert 2.52) ein lila farbener Fleck sichtbar. Unter dem langwelligeren UV-Licht beobachteten wir bei R_f -Wert 0.32 (R_G -Wert 0.96) eine schwach dunkelblau fluoreszierende weitere Zone und dicht darunter eine intensiv hellgrün fluoreszierende Bande mit einem R_f -Wert von 0.27 (R_G -Wert 0.81). Beide Flecken zeigten weder mit Osmiumtetroxid noch mit alkalischer Kaliumpermanganat-Lösung eine positive Reaktion. Mit Vanillin-Schwefelsäure entwickelten diese beiden Stoffe nach längerem Erhitzen eine schwach graue Färbung.

Die chromatographische Abtrennung der Terpenkohlenwasserstoffe (TKW) führten wir nach der Technik von MILLER und KIRCHNER¹⁷⁾¹⁸⁾¹⁹⁾²⁰⁾ an einer Kieselgel-Säule durch. Nach vollständiger Elution der Kohlenwasserstoffe mit Petroläther gewannen wir die sauerstoffhaltigen Bestandteile (Terpenoid-Fraktion) durch Elution mit Äther zurück.

Beim Aufbewahren der Petrolätherlösung der TKW-Fraktion bei 0° schied sich innerhalb kurzer Zeit ein weißer fleckiger Niederschlag ab. Wir vermuteten, daß es sich hierbei um höhere Paraaffinkohlenwasserstoffe handelte. Ihre Abtrennung gelang durch Harnstoff-Addukt-Bildung nach SCHLENK²¹⁾ und WOLF²²⁾. Die weitere Aufarbeitung und Identifizierung der Terpenkohlenwasserstoff-Fraktion (TKW II) erfolgte nach Schema 2.

Wie aus dem Schema 2, S.19, hervorgeht, brachte die Fraktionierung an Kieselgel folgendes Ergebnis:

Die Fraktionen 1 bis 3 enthielten geringe Mengen an paraffin-ähnlichen Substanzen.

Die Fraktionen 4 bis 6 stellten leicht bewegliche, terpenartig riechende Flüssigkeiten dar.

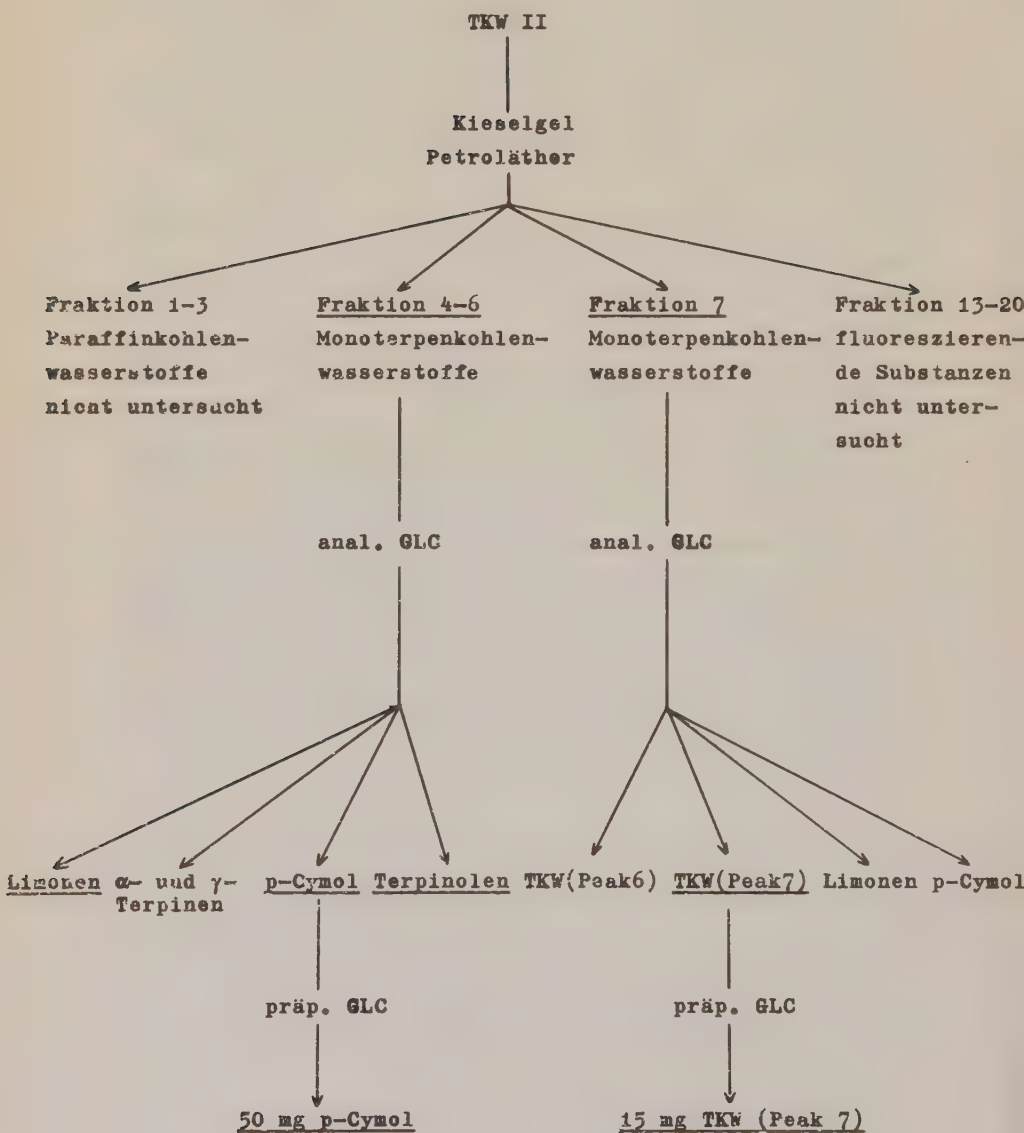
Die Fraktionen 8 bis 12 waren leer.

Die Fraktionen 13 bis 20 enthielten die beiden fluoreszierenden Stoffe mit den R_f -Werten 0.32 und 0.27.

Die Fraktionen 1 bis 3 wurden nicht untersucht.

Die Fraktionen 4 bis 6 dienten der gaschromatographischen Untersuchung. Es gelang die Identifizierung folgender Terpenkohlenwasserstoffe: Limonen, α -Terpinen, Terpinolen und p-Cymol.

S c h e m a 2

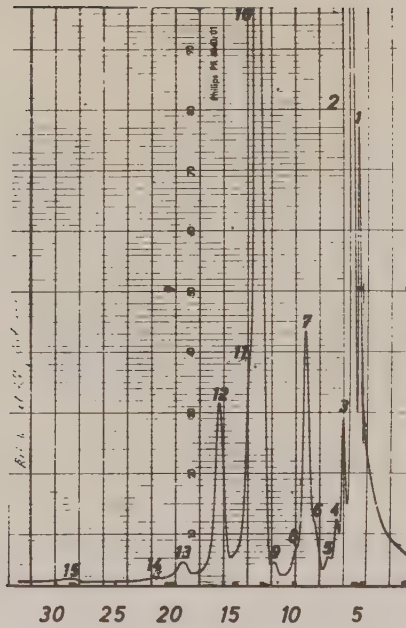


Durch präparative Gaschromatographie isolierten wir aus den Fraktionen 4 bis 6 p - C y m o l und aus der Fraktion 7 einen Kohlenwasserstoff, der durch Peak 7 auf der Reoplex-Säule charakterisiert war.

Die gaschromatographische Identifizierung oben genannter Verbindungen erfolgte an 4 stationären Phasen verschiedener Polarität, und zwar an Apiezon L (AL), Reoplex 400 (R 400), LAC 1E 296 (LAC) und β, β -Oxydipropionitril (OPN). Apiezon L als apolare Phase trennt die Kohlenwasserstoffe im wesentlichen nach ihren Siedepunkten auf. Die beiden Polyesterphasen R 400 und LAC besitzen als polare Trennflüssigkeiten gegenüber den TKW eine Selektivität und trennen diese nach ihren Siedepunkten und ihrer Polarisierbarkeit. Die stark polare Phase OPN weist gegenüber den Kohlenwasserstoffen die höchste Selektivität auf und trennt die TKW ausschließlich nach der Stärke ihrer Polarisierbarkeit.

Die folgenden 4 Abbildungen (Abb. 8, 9, 10, 11, S. 21-24) zeigen die Gaschromatogramme der Terpenkohlenwasserstoffe auf den 4 verschiedenen stationären Phasen.

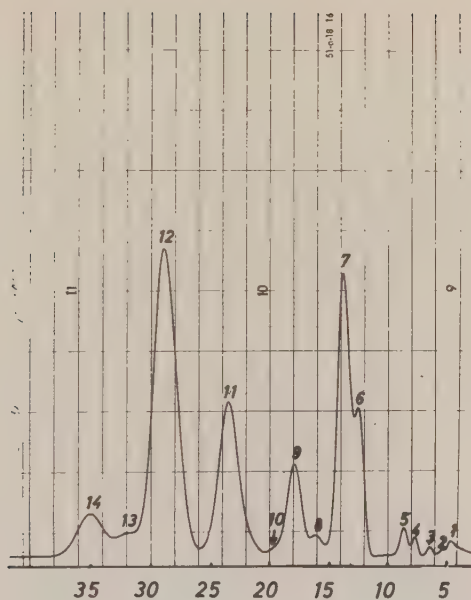
Die Identifizierung der einzelnen Kohlenwasserstoffe des Lindenblütenöls erfolgte durch Vergleich mit Testsubstanzen. Dazu wurden die relativen Retentionsvolumina (bezogen auf Limonen) der für jede Säule nummerierten Substanzpeaks und der in Tabelle 5, S. 25, aufgeführten Testsubstanzen verwendet. Bei Übereinstimmung der Retentionsvolumina der unbekannten und der Testsubstanz innerhalb einer Fehlergrenze von 2%, mischten wir die in Frage kommende Testsubstanz zur Analysenprobe. Bei Identität der unbekannten Komponente mit der Testsubstanz mußte sich die Peakfläche ohne Veränderung der Peaksymmetrie vergrößern.



← Zeit (Min.)

Abb. 8

Gaschromatogramm der Terpenkohlenwasserstoffe des Lindenblütenöls
 Säule: 3 m x 4 mm, Apiezon L auf Chromosorb WS (45-60 mesh) 20%ig
 Temperatur: 120°C



← Zeit (Min.)

Abb. 9

Gaschromatogramm der Terpenkohlenwasserstoffe des Lindenblütenöls

Säule: 3 m x 4 mm, Reoplex 400 auf Chromosorb WS (45-60 mesh)

Temperatur: 85°C

20%lg

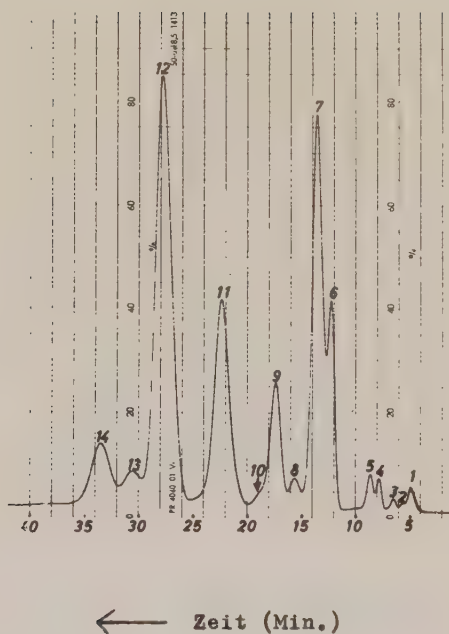


Abb. 10

Gaschromatogramm der Terpenkohlenwasserstoffe des Lindenblütenöls

Säule: 2.4 m x 4 mm, LAC 1R 296 auf Chromosorb WS (45-60 mesh)

Temperatur: 85°C

20%ig

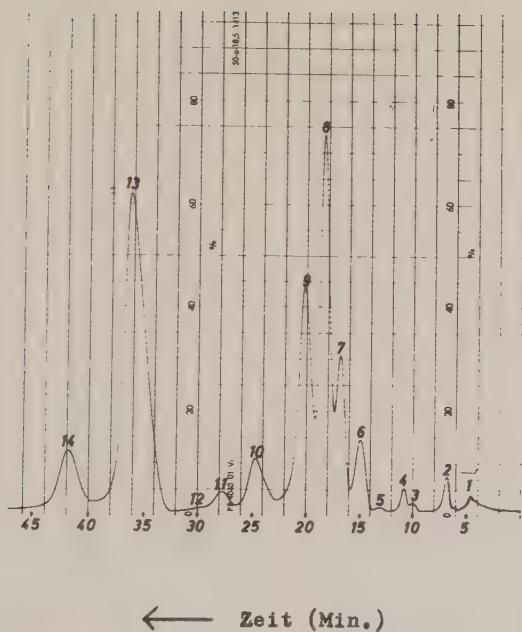


Abb. 11

Gaschromatogramm der Terpenkohlenwasserstoffe des Lindenblütenöls

Säule: 3 m x 4 mm, β , β -Oxydipropionitril auf Chromosorb WS
(45-60 mesh) 15%ig

Temperatur: 70°C

T a b e l l e 5

Siedepunkte und relative Retentionsvolumina der zum Vergleich
benutzten Testsubstanzen

Verbindung	Siedepunkt(52) 760 mm(Hg)	Abkürzung	stationäre Phase			
			AL	R400	LAC	OPN
Myrcen	167	A 1	520	772	769	868
Ocimen cis	171 ^{±5} *)	A 2	821	1187	1187	1428
Ocimen trans	176 ^{±5} *)	A 33	948	1319	1319	1670
α-Terpinen	173.4	M 1	830	881	897	1000
α-Phellandren	171.5	M 2	806	830	830	794
γ-Terpinen	183	M 3	1169	1303	1281	1360
β-Phellandren	178	M 4	1040	1078	1078	1170
Limonen(Dipenten)	178	M 5	1000	1000	1000	1000
Terpinolen	186	M 6	1394	1747	1747	1630
p-Cymol	175-177	AM 7	930	1592	1598	2382
α-Pinen	156	B 1	521	265	368	276
β-Pinen	164	B 2	704	445	488	560
Sabinen	164	B 3	577	692	701	720
Camphen	158-160	B 4	577	355	488	450

*) interpoliert von Abb. 14, S. 30

In den folgenden Tabellen 6, 7, 8 und 9 sind für jede stationäre Phase die durch Vergleich der relativen Retentionsvolumina gewonnenen Ergebnisse aufgeführt. Tabelle 10, S.28, bringt eine Zusammenfassung der mit Hilfe der 4 stationären Phasen identifizierten Terpenkohlenwasserstoffe des Lindenblütenöls.

T a b e l l e 6

Relative Retentionsvolumina der Bestandteile der TKW-Fraktion
des Lindenblütenöls
Stationäre Phase: Reoplex 400

Peak	V_{rel}		Testsubstanz	Unterschied %
	Lindenblüten	Testsubstanz		
6	705	692	Sabinen	1.84
7	770	772	Myrcen	0.27
8	894	881	α -Terpinen	1.45
9	1000	1000	Limonen	0
11	1307	1303	γ -Terpinen	0.3
12	1676	1592	p-Cymol	5.0
13	1787	1747	Terpinolen	2.3

T a b e l l e 7

Relative Retentionsvolumina der Bestandteile der TKW-Fraktion
des Lindenblütenöls
Stationäre Phase LAC 1R 296 (Limonen = 1000)

Peak	V_{rel}		Testsubstanz	Unterschied %
	Lindenblüten	Testsubstanz		
6	707	701	Sabinen	0.86
7	781	769	Myrcen	1.54
8	896	897	α -Terpinen	0.11
9	1000	1000	Limonen	0
11	1287	1281	γ -Terpinen	0.47
12	1598	1598	p-Cymol	0
13	1758	1747	Terpinolen	0.63

T a b e l l e 8

Relative Retentionsvolumina der Komponenten der Terpenkohlen-
wasserstoff-Fraktion des Lindenblütenöls
Stationäre Phase: β,β -Oxydipropionitril (Limonen = 1000)

Peak	V_{rel}		Testsubstanz	Unterschied %
	Lindenblüten	Testsubstanz		
6	1000	1000	Limonen	0
6	1000	1000	α -Terpinen	0
9	1325	1360	γ -Terpinen	2.6
10	1606	1630	Terpinolen	1.5
13	2319	2382	p-Cymol	2.7

T a b e l l e 9

Relative Retentionsvolumina der Komponenten der Terpenkohlen-
wasserstoff-Fraktion des Lindenblütenöls
Stationäre Phase: Apiezon L (Limonen = 1000)

Peak	V_{rel}		Testsubstanz	Unterschied %
	Lindenblüten	Testsubstanz		
9	831	830	α -Terpinen	0.12
10	930	930	p-Cymol	0
11	979	1000	Limonen	2.1
12	1155	1169	γ -Terpinen	1.2
13	1366	1394	Terpinolen	2.0

T a b e l l e 10

Relative Retentionsvolumina der identifizierten Komponenten der TKW-Fraktion des Lindenblütenöls
Stationäre Phasen: Reoplex 400, LAC 1R 296, β , β -Oxydipropionitril und Apiezon L. (Limonen = 1000)

Reoplex 400		LAC 1R 296		β , β -Oxydipropionitril		Apiezon L	
Peak	V_{rel}	Peak	V_{rel}	Peak	V_{rel}	Peak	V_{rel}
Testsub. L-Blüten		Testsub. L-Blüten		Testsub. L-Blüten		Testsub. L-Blüten	
8	881 (α -Terpinen)	894	897 (α -Terpinen)	896	6 (α -Terpinen)	9	830 (α -Terpinen)
9	1000 (Limonen)	1000	1000 (Limonen)	1000	6 (Limonen)	11	1000 (Limonen)
11	1303 (γ -Terpinen)	1307	1281 (γ -Terpinen)	1287	9 (γ -Terpinen)	12	1169 (γ -Terpinen)
12	1592 (p-Cymol)	1676	1598 (p-Cymol)	1598	13 (p-Cymol)	10	930 (p-Cymol)
13	1747 (Terpinolen)	1787	1747 (Terpinolen)	1758	10 (Terpinolen)	13	1344 (Terpinolen)

Mittels präparativer Gaschromatographie gelang nach Schema 2 aus den Fraktionen 4 bis 6 die Isolierung der Hauptkomponente. Sie entsprach auf der R 400-Säule Peak 12 und wurde gaschromatographisch als p-Cymol identifiziert. Die auf diese Weise abgetrennte Substanz des Terpengemisches (Peak 12) lieferte ein UV-Spektrum, dessen Maxima (259 m μ , 265 μ , 267 m μ und 273 m μ) nach Lage und Intensität mit denen von authentischem p-Cymol übereinstimmen (Abb. 12). Auch das IR-Überlagerungsspektrum zeigte völlige Übereinstimmung (Abb. 13, S. 30).

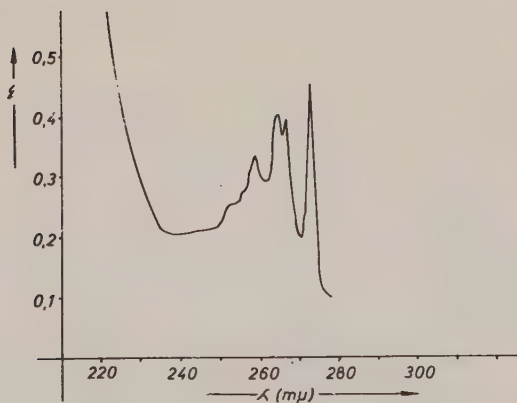


Abb. 12

UV-Spektrum von p-Cymol

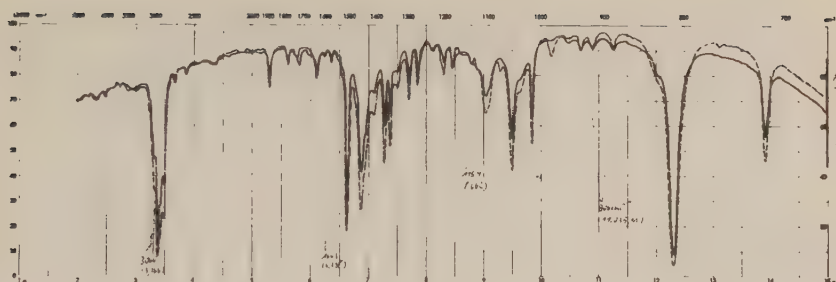


Abb. 13

IR-Überlagerungsspektrum von authentischem und isoliertem p-Cymol

Außerdem konnten wir aus den Fraktionen 4 bis 6 zwei Substanzen isolieren, die auf der E 400-Säule Peak 6 und 7 ergaben.

Für die Siedepunkte beider Stoffe errechneten wir anhand der graphischen Darstellung in Abb. 14 $139 \pm 5^\circ$ für Peak 6 und 144 ± 5 für Peak 7.

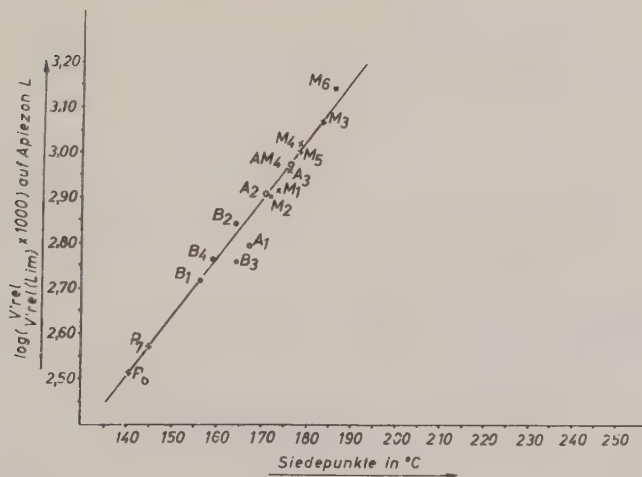


Abb. 14

Beziehung zwischen den Logarithmen der relativen Retentionsvolumina und den Siedepunkten der Monoterpenkohlenwasserstoffe auf Apiezon L.

Nach den relativen Retentionsvolumina (Abb. 15, 16, 17) waren die beiden Substanzen weder in die Gruppe der aliphatischen noch in die Gruppe der mono- oder bicyclischen Monoterpenkohlenwasserstoffe einzuordnen. Sie fielen in die Klasse der Benzolderivate.

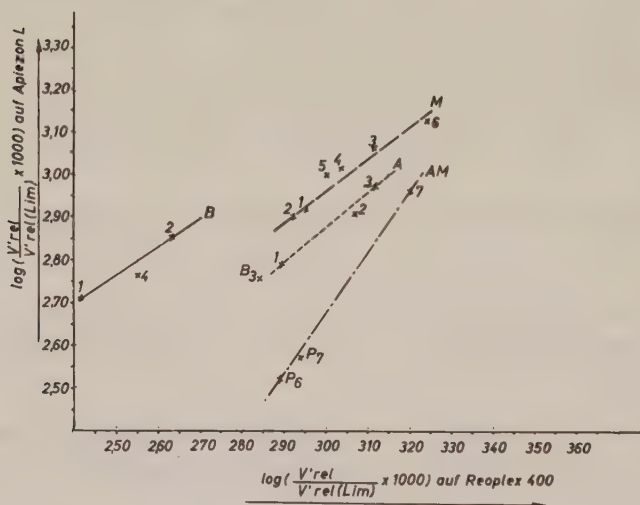


Abb. 15

Logarithmen der relativen Retentionsvolumina von Apiezon L aufgetragen gegen die von Reoplex 400

- A = aliphatische Terpene
- M = monocyclische Terpene
- B = bicyclische Terpene
- AM = aromatische Kohlenwasserstoffe

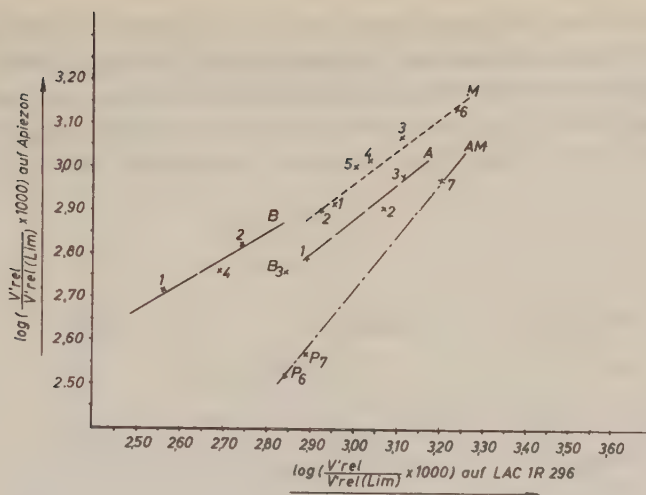


Abb. 16

Logarithmen der relativen Retentionsvolumina von Apiezon L aufgetragen gegen die von LAC 1R 296

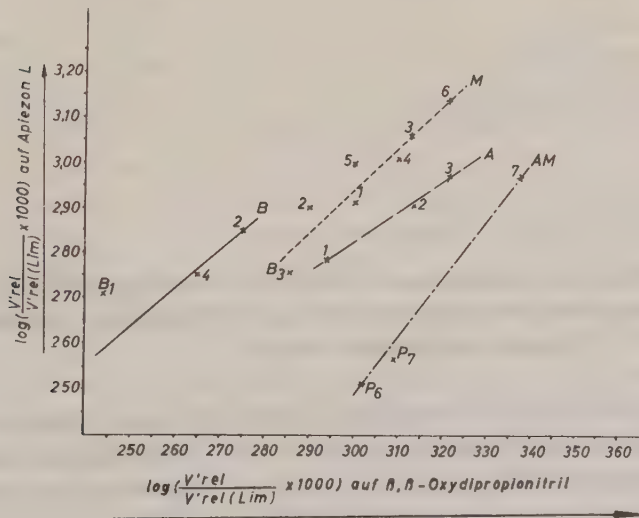


Abb. 17

Logarithmen der relativen Retentionsvolumina von Apiezon L aufgetragen gegen die von β, β -Oxydipropionitril

Nach einem Auftrageschema, das von KLOUWEN und TER HEIDE²³⁾ zur Unterscheidung der aliphatischen, monocyclischen und bicyclischen Monoterpenkohlenwasserstoffe und der aromatischen Körper benutzt wurde, war für die beiden Stoffe ebenfalls eine aromatische Struktur anzunehmen (Abb. 18).

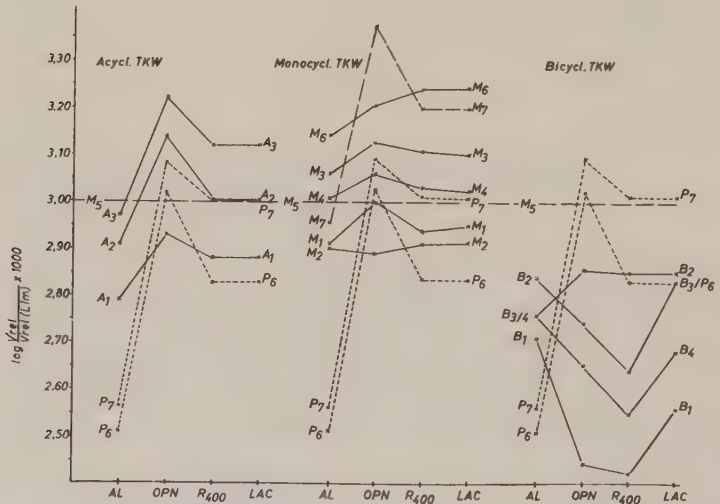


Abb. 18

Auftrageschema der Logarithmen relativer Retentionsvolumina einer Reihe von Monoterpenkohlenwasserstoffen auf 4 verschiedenen stationären Phasen

Die aus Fraktion 7 erhaltene zweite Substanz (Peak 7) lieferte ein UV-Spektrum, das die für aromatische Systeme typische Feinstrukturierung zeigte und Maxima bei 260, 265, 269 und 273 mμ besaß (Abb. 19, S. 34).

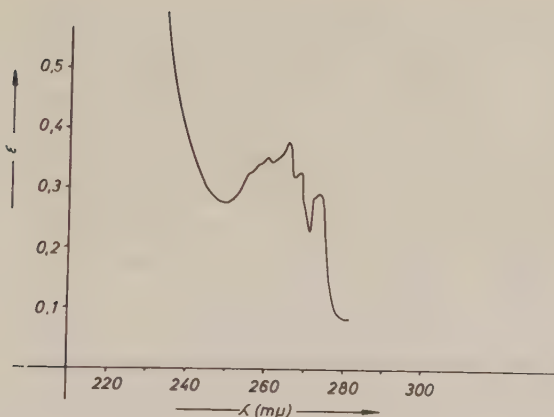


Abb. 19

UV-Spektrum des Kohlenwasserstoffes Peak 7

Das IR-Spektrum dieser Substanz (Abb. 20, S.35) ließ ebenfalls eine aromatische Struktur erkennen. Dafür sprach die aromatische CH-Valenzschwingungsbande bei 3030 cm^{-1} . Die -C=C- bzw. $\gamma\text{-C=C-}$ Valenzschwingungsbanden lagen bei 1600 bzw. 1495 cm^{-1} . Die für Aromaten typischen wagging-Schwingungsbanden erschienen bei 765 und 685 cm^{-1} . Ihre Lage ließ auf einen monosubstituierten Aromaten schließen.

Die Banden bei 2930 und 2880 cm^{-1} stammten von asymmetrischen bzw. symmetrischen CH-Valenzschwingungen. Die entsprechenden asymmetrischen und symmetrischen CH-Deformationsschwingungen lagen bei 1450 und 1370 cm^{-1} . Aufgrund des IR-Spektrums dieser Substanz könnte man einen monoalkyl-substituierten Aromaten annehmen. Eine weitere Identifizierung gelang nicht.

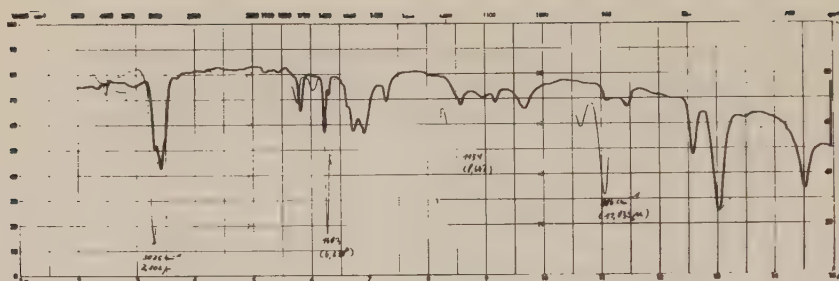


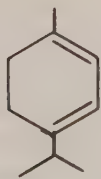
Abb. 20

IR-Spektrum des Kohlenwasserstoffes Peak 7

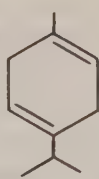
Formelübersicht über die identifizierten Terpenkohlenwasserstoffe des Lindenblütenöls



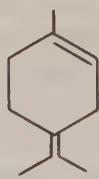
Limonen



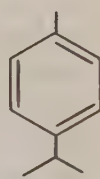
α -Terpinen



γ -Terpinen



Terpinolen



p-Cymol

III. Untersuchung der Fraktion der Carbonylverbindungen

1. Abtrennung der Carbonylverbindungen

Die bei der dünnenschichtchromatographischen Voruntersuchung im Lindenblütenöl nachgewiesenen Carbonylverbindungen trennten wir mit Hilfe von Acylhydraziden mit tertiärer oder quarternärer Stickstoff-Funktion (Girard-Reagentien) ab. Diese Reagentien bilden unter milden Bedingungen mit wasserunlöslichen Aldehyden und Ketonen wasserlösliche Hydrazone, die beim Extrahieren der fettlöslichen Komponenten mit organischen Lösungsmitteln wie Äther, Methylenchlorid und Benzol quantitativ in der wässrigen Lösung verbleiben. Die Hydrazone können anschließend unter milden Bedingungen ohne vorherige Isolierung in der wässrigen Lösung zurückgespalten werden. Eine Abtrennung der Carbonylverbindungen ist auch dann noch möglich, wenn die Oxoverbindungen nur einen verschwindenden Bruchteil des Gemisches ausmachen. Auf diese Weise gelang es REICHSTEIN²⁴⁾, sowie BUTENANDT²⁵⁾ und WINTERSTEINER²⁶⁾ die Nebennierenrinden-Hormone abzutrennen. Auch auf dem Gebiet der ätherischen Öle wurden die Girard-Reagentien zur Abtrennung von Carbonylverbindungen häufig benutzt²⁷⁾²⁸⁾.

Von den Reagentien P, T²⁹⁾, D³⁰⁾ und dem nach BARNETT³¹⁾ schien uns das Reagenz D am vorteilhaftesten, da es neben seiner Stabilität und fehlenden hygroskopischen Eigenschaften schneller und vollständiger als die übrigen Reagentien reagiert. Außerdem bilden wässrige Lösungen von Girard D-Hydrazone langkettiger Carbonylverbindungen beim Ausschütteln mit Benzol oder Methylenchlorid im Gegensatz zu den Derivaten der anderen Girard-Reagentien keine störenden Emulsionen.

Die Reaktionsbedingungen wurden von den verschiedenen Autoren verschieden gewählt. GIRARD und SANDULESCO²⁹⁾ arbeiteten im essigsäuren Milieu, während TEITELBAUM³²⁾

ein saures Ionenaustauscherharz verwendete. Im Gegensatz dazu arbeiteten LEDERER und NACHMIAS³³⁾ im neutralen Milieu und verwendeten hierbei 150% der theoretisch notwendigen Menge an Reagenz in 5 bis 10%iger alkoholischer Lösung. Im Hinblick auf die Ergebnisse von NAVES³⁴⁾, der feststellte, daß sich empfindliche Oxoverbindungen schon im essigsauren Milieu isomerisieren können, führten wir die Umsetzung in neutraler Lösung aus.

Die Zersetzung der Girard-Hydrazone erfolgt meistens mit verdünnten Säuren (0.5 - 1 N). GIRARD und SANDULESCO²⁹⁾ behaupteten in ihrer Arbeit, daß Aldehyd-Hydrazone mit den genannten Säurekonzentrationen nur unvollkommen spaltbar sind. LEDERER³³⁾ und später FORSS³⁵⁾ widerlegten in ihren Arbeiten diese Auffassung. LEDERER wies außerdem daraufhin, daß bei der Abtrennung von Aldehyden die verwendeten Girard-Reagentien absolut hydrazinfrei sein müssen, da sonst stabile und wasserunlösliche Azine entstehen, die sich der Abtrennung entziehen. Wir prüften deshalb das verwendete Reagenz D nach PESEZ und PETIT³⁶⁾ auf Anwesenheit von Hydrazin.

Zur Regenerierung der Oxoverbindungen aus den Hydrazonen verwendete TEITELBAUM³²⁾ Formalin, da er bei empfindlichen Oxoverbindungen wie Citral bei saurer Hydrolyse eine vollständige Zersetzung desselben nachwies. Wir konnten die Ergebnisse von TEITELBAUM bestätigen und benutzten ebenfalls Formalin zur Regeneration der Carbonylverbindungen. Mit Formalin ließen sich sowohl Aldehyde als auch Ketone in guten Ausbeuten aus den Girard-Hydrazonen erhalten.

Durch Umsetzen des ätherischen Lindenblütenöls mit Reagenz D und nachfolgende Zersetzung der Hydrazonfraktion mit Formalin erhielten wir 0.8 g Carbonylverbindungen.

2. Gaschromatographische Untersuchung der Carbonylverbindungen

Die Carbonylverbindungen wurden an einer LAC 1R 296-Säule aufgetrennt (Abb. 21).

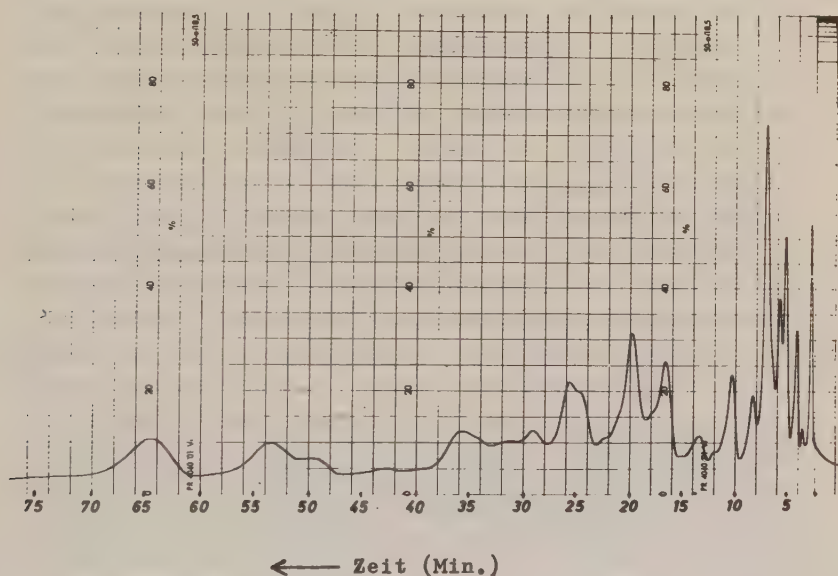


Abb. 21

Gaschromatogramm der Carbonylverbindungen

Säule: 2.4 m x 4 mm, LAC 1R 296 auf Kieselgur (0.1-0.2 mm) 20%
Temperatur: 125°C

Die Fraktion der Carbonylverbindungen trennte sich gaschromatographisch in nicht weniger als 26 Substanzen auf. Wir verzichteten deshalb auf Identifizierungsversuche und trennten die Carbonylverbindungen weiter in eine Aldehyd- und eine Ketonfraktion auf.

3. Trennung der Carbonylverbindungen in eine Aldehyd- und eine Ketonfraktion

Zur Trennung von Aldehyden und Ketonen wurden in der Literatur mannigfache Reagentien beschrieben. EINHORN³⁷⁾³⁸⁾ entwickelte Kohlensäurehydrazide von Brenzcatechin, Resorcin und Hydrochinon, die sich nur mit Aldehyden umsetzen und infolge der sauren Funktion der Hydrazide von den übrigen Bestandteilen abtrennbar sind. Wir prüften das Brenzcatechinkohlensäurehydrazid an gesättigten und ungesättigten Terpenaldehyden und fanden, daß sich dieses Hydrazid mit den genannten Aldehyden nur unvollständig umsetzt. Ebenso wenig eignete sich für unser Problem die von TREIBS und RÖHNERT³⁹⁾ als Ketonreagenz beschriebene Phenylhydrazin-p-sulfonsäure. UTZINGER und REGENASS⁴⁰⁾ benutzten das N,N-Dimethyl-p-phenylendiamin zur Abtrennung der Aldehyde in Form ihrer Anile. Nach unseren Erfahrungen reagiert dieses Reagenz mit Aldehyden zwar schnell und vollständig, doch ist es schwierig, infolge der leichten Zersetzlichkeit des Phenylendiamins die umgesetzten Aldehyde von den Ketonen sauber abzutrennen. Wir benutzten schließlich zur Trennung die von mehreren Autoren⁴¹⁾⁴²⁾⁴³⁾ erfolgreich angewandte Methode der Oxydation mit Silberoxid in schwach alkalischer Lösung. Hierbei werden sogar empfindliche Aldehyde ohne Nebenreaktionen in guten Ausbeuten in die entsprechenden Carbonsäuren überführt. Die Ketonbestandteile können unverändert durch Ausschütteln der wässrig-alkalischen Phase mit organischen Lösungsmitteln zurückgewonnen werden. Durch Ansäuern der wässrigen Phase lassen sich die den Aldehyd entsprechenden Carbonsäuren erhalten.

Wir erhielten nach dieser Methode 0.2 g Carbonsäuren und 0.45 g Ketone.

4. Untersuchung der Carbonsäure-Fraktion

Die durch Silberoxid-Oxydation erhaltenen Carbonsäuren methylierten wir und führten einen Teil der Methylester in die Hydroxamsäuren über. Diese chromatographierten wir wie im Kapitel Säuren beschrieben wurde an a c e t y - l i e r t e m P a p i e r mit Äthylacetat/Tetrahydrofuran/Wasser 12:70:94. Zum Sichtbarmachen der Flecken diente eine Eisen-III-chlorid-Lösung und zum Nachweis des ungesättigten Charakters der Substanzflecke verwendeten wir Osmiumtetroxid-Dampf.

Das Papierchromatogramm wies einen Hauptfleck mit einem R_f -Wert von 0.36 und zwei schwächere Flecken mit den R_f -Werten 0.46 und 0.53 auf. Während der Hauptfleck mit Osmiumtetroxid keine eindeutig positive Reaktion zeigte, reagierten die beiden Nebenflecken eindeutig, was auf einen ungesättigten Charakter der beiden Substanzflecke schließen ließ.

Die G a s c h r o m a t o g r a p h i e der Carbonsäuremethylester führten wir an zwei Polyester-Säulen (LAC 1R 296 und Diäthylenglykolsuccinatpolyester) (Abb. 22 und 23, S. 41/42) bei einer Temperatur von 125°C durch.

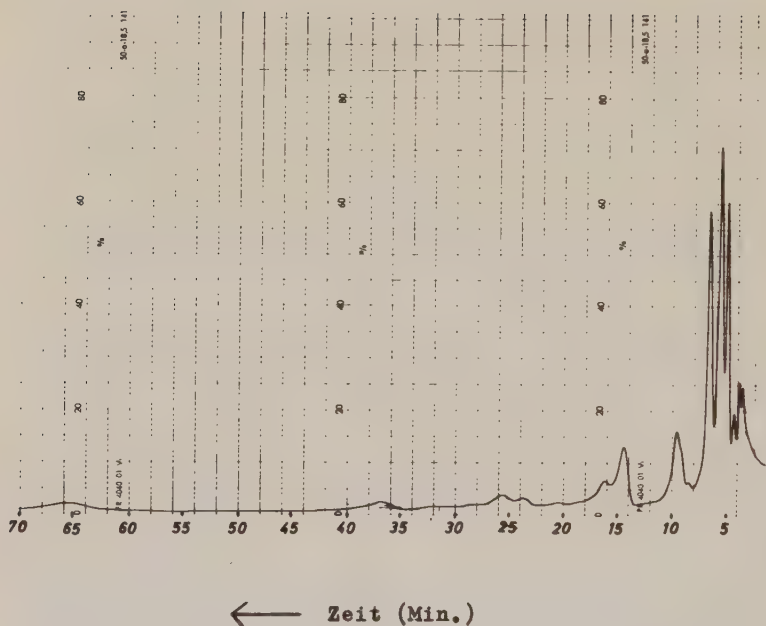
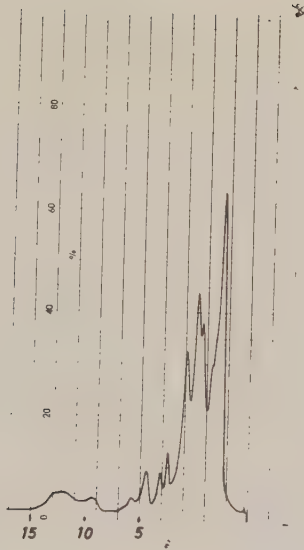


Abb. 22

Gaschromatogramm der Carbonsäuremethylester

Säule: 2.4 m x 4 mm, LAC 1R 296 auf Kieselgur (0.1-0.2 mm) 20%

Temperatur: 125°C



← Zeit (Min.)

Abb. 23

Gaschromatogramm der Carbonsäuremethylester

Säule: 2.4 m x 4 mm, Diäthylenglykolsuccinatpolyester auf Kieselgur (0.1-0.2 mm) 20%

Temperatur: 125°C

Den beiden Chromatogrammen zufolge bestand der Hauptteil der Fraktion aus niedrig siedenden Anteilen mit einer ungefähren Kohlenstoffanzahl von 6 bis 7. Da aber nach den papierchromatographischen Ergebnissen der Hauptteil der Fraktion aus Substanzen mit einer höheren Kohlenstoffzahl bestehen mußte, chromatographierten wir die Fraktion bei höherer Temperatur (165°C) auf einer Apiezon L- und auf einer Polyester-Säule (EGSS-X). Wir erhielten auf beiden Gaschromatogrammen einen Hauptpeak mit den Retentionszeiten von 14 Min. für Apiezon L und 19 Min. 5 sec. für die Polyester-Säule (EGSS-X). Der Vergleich der Retentionszeiten beider Säulen zeigte, daß es sich bei dieser Substanz um eine Verbindung mit einer Doppelbindungszahl von mindestens 3 handeln mußte. Da die Osmiumtetroxid-Anfärbung auf dem Papierchromatogramm der Hydroxamsäuren keine eindeutige Reaktion ergab, lag die Vermutung nahe, daß es sich bei dieser Verbindung um einen aromatischen Körper handelte.

Zunächst versuchten wir den niedrig siedenden Anteil dieser Fraktion gaschromatographisch durch Vergleich mit Testsubstanzen näher zu charakterisieren. In Frage kamen die Methyl ester der Capronsäure, der 2-Hexen-, der 3-Hexen- und der 2-Heptensäure. Während der 2-Hexensäuremethylester auf der LAC-Säule mit Peak 5 Übereinstimmung zeigte, wies dieser auf der zweiten Polyester-Säule einen geringfügigen Unterschied in der Retentionszeit auf. Ohne Isolierung war eine exakte Identifizierung unmöglich.

5. Isolierung und Identifizierung der Hauptsubstanz der Aldehyd-Fraktion

Zur I s o l i e r u n g reduzierten wir die den Aldehyden entsprechenden Säuremethylester mit Lithiumaluminiumhydrid zu den Alkoholen und oxydierten diese anschließend mit Chromsäure in Eisessig zu den Aldehyden. Die erhaltenen Aldehyde setzten wir sofort mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin

um. Wir erhielten einen tiefrot gefärbten Hydrazon-Niederschlag. Die dünnschichtchromatographische Untersuchung dieses Hydrazons an Kieselgel G mit Hexan/Äther 9:1 als Fließmittel ergab bei einem R_f -Wert von 0.34 einen Hauptfleck und daneben 6 weitere Substanzflecken, die aber mengenmäßig in weit geringerem Maße vertreten waren, so daß uns eine säulenchromatographische Isolierung dieses Aldehyd-Hydrazons erfolgversprechend schien. Zur chromatographischen Trennung verwandten wir neutrales mit 6% Wasser desaktiviertes Aluminiumoxid und ein Benzin/Äther-Gemisch 95:5 als Elutionsmittel. Die einzelnen Fraktionen wurden dünnschichtchromatographisch überprüft. Die Fraktionen 9 mit 17 wurden vereinigt und ergaben nach Umkristallisieren aus Benzol eine rote amorphe bei 242°C schmelzende Substanz, die sowohl adsorptions- als auch verteilungschromatographisch einheitlich war. Die zunächst amorphe Verbindung ging bei einer Temperatur von etwa 100°C in den kristallinen Zustand über und lieferte feine rote Nadeln.

Zur weiteren Identifizierung zogen wir das IR-(Abb.24) und das UV-Spektrum (Abb.25) heran.

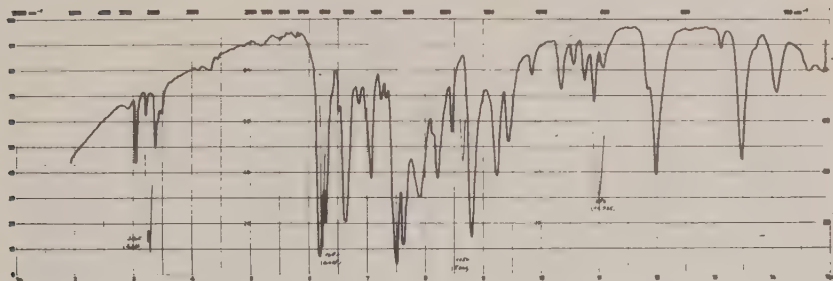


Abb. 24

IR-Spektrum des Aldehyd-DNPH

Wie ROSS⁴⁴⁾ sowie JONES, HOLMES und SELIGMAN⁴⁵⁾ gezeigt haben, gelingt es an Hand des IR-Spektrums einige Aussagen zur Struktur zu machen.

Die NH-Valenzschwingung bei 3279 cm^{-1} lag in dem für Aldehyd-DNPH charakteristischen Bereich. Neben der Valenzschwingungsbande des Phenylrings bei 3115 cm^{-1} erschien bei 2959 cm^{-1} die Bande der aliphatischen CH-Valenzschwingung. Die Banden bei 970 und 917 cm^{-1} deuteten auf einen ungesättigten Aldehyd hin. Aufgrund der Banden bei 1383 und 1183 cm^{-1} war eine Isopropylverzweigung wahrscheinlich. Wegen der wenig komplexen Struktur des Spektrums im Bereich von 1667 bis 1429 cm^{-1} und des Fehlens starker Banden im Bereich von 769 bis 666 cm^{-1} war das Vorliegen eines olefinischen Aldehyds zu vermuten.

Zur weiteren Strukturermittlung dienten die in neutraler⁴⁵⁻⁴⁹⁾ und in basischer⁴⁵⁾⁴⁸⁾⁵⁰⁾ Lösung gemessenen UV-Spektren (Abb. 25).

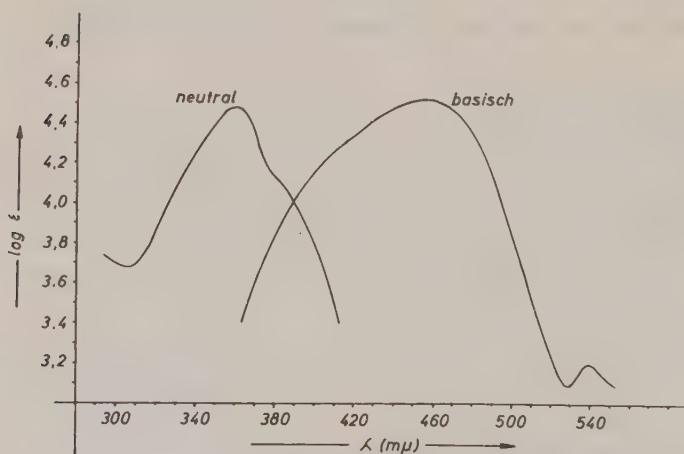


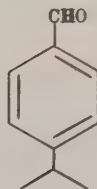
Abb. 25

UV-Spektrum des Aldehyd-DNPH in neutraler und basischer Lösung

Das Hauptmaximum des in neutraler Lösung aufgenommenen Spektrums lag bei 367 m μ (Isooctan), während das entsprechende "alkalische Spektrum" (Chloroform) ein Hauptmaximum bei 464 m μ und ein beständiges "Nebenmaximum" bei 564 aufwies. NASAROW⁵¹⁾ legt für die Lage des Hauptmaximums im Formaldehyd einen Wert von 330 m μ zugrunde. Für jede weitere Alkyl- oder Arylsubstitution in α -Stellung zur Carbonylgruppe stellte der Autor eine bathochrome Verschiebung von 7 m μ fest. Eine Doppelbindung in α -Stellung soll eine entsprechende Verschiebung um 17 m μ , eine zweite in Konjugation stehende Doppelbindung das Maximum um weitere 9 m μ bathochrom verschieben. Das Maximum bei 367 m μ sprach demzufolge für einen aromatischen Aldehyd ($330+17+9+7=363$) oder einen Aldehyd nachstehender Struktur:
 $R^1-CH=CH-CH=CHR-CHO$.

Der Vergleich mit bekannten Aldehyd-DNPH erbrachte Identität mit Cuminaldehyd-DNPH, dessen Schmelzpunkt in der Literatur mit 241°C⁵²⁾ und 243°C⁵³⁾ angegeben wird. Auch das isolierte Aldehyd-DNPH stimmte im Mischschmelzpunkt und den Elementaranalysen mit dem Hydrazone des Cuminaldehyds überein. Somit war die Anwesenheit von Cuminaldehyd nicht mehr zweifelhaft.

Formelübersicht



Cuminaldehyd

6. Untersuchung der Ketonfraktion

Die Gaschromatographie der Ketonfraktion erfolgte ebenfalls an zwei Polyester-Säulen (LAC 1R 296 und Diäthylenglykolsuccinatpolyester) (Abb. 26 und 27).

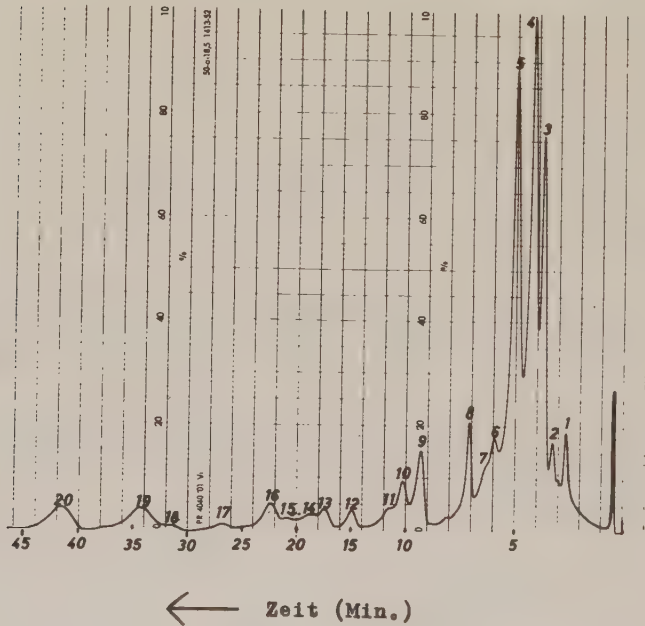


Abb. 26

Gaschromatogramm der Ketonfraktion

Säule: 2.4 m x 4 mm, LAC 1R 296 auf Kieselgur (0.1-0.2) 20%
Temperatur: 125°C

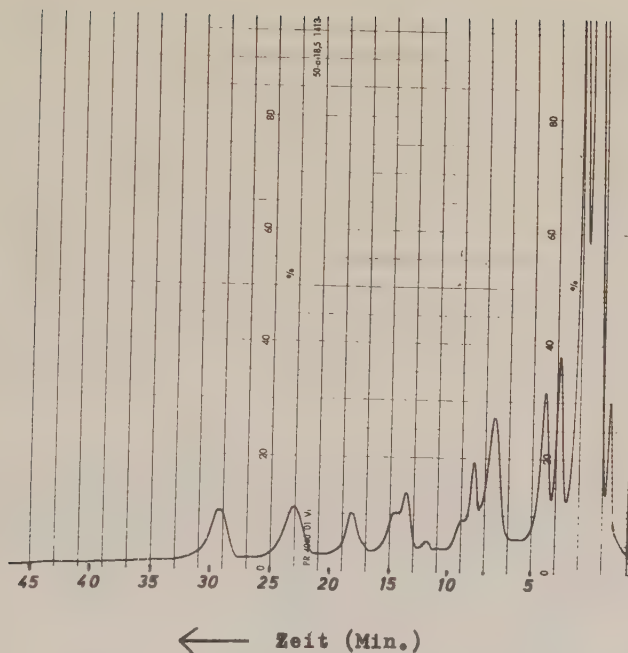


Abb. 27

Gaschromatogramm der Ketonfraktion

Säule: 2.4 m x 4 mm, Diäthylenglykolsuccinatpolyester auf
Kieselgur (0.1-0.2 mm) 20%

Temperatur: 125°C

Beide Gaschromatogramme zeigten, daß auch die Ketonfraktion ein kompliziert zusammengesetztes Gemisch mit hauptsächlich niedrig siedenden Anteilen darstellt.

Da auch hier eine gaschromatographische Identifizierung mangels Testsubstanzen praktisch unmöglich war, setzten wir die Ketonfraktion zur Isolierung einzelner Verbindungen mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin um. Die Auftrennung der Keton-2,4-Dinitrophenylhydrazone erfolgte an neutralem mit 6% Wasser desaktiviertem Aluminiumoxid. Als Elutionsmittel diente Benzin/Äther 95:5. Aus den Fraktionen 1 mit 5 erhielten wir etwa 35 mg eines festen Substanzgemisches. Die erneute Chromatographie an neutralem Aluminiumoxid der Aktivitätsstufe II ergab ein Stoff-Gemisch, das nach abermaliger Reinigung an neutralem Aluminiumoxid mit Benzol/Benzin 1:1 als Elutionsmittel 5 mg eines orangeroten Dinitrophenylhydrazons lieferte. Nach einmaligem Umkristallisieren aus 95% Äthanol kristallisierte es in derben Nadeln, die bei 135°C schmolzen.

Das UV-Spektrum des Keton-DNPH (Abb. 28) hatte in neutraler Lösung ein Maximum bei $344\text{ m}\mu$ und in alkalischer Lösung ein Hauptmaximum bei $432\text{ m}\mu$ und ein 2. Maximum geringerer Intensität bei $530\text{ m}\mu$.

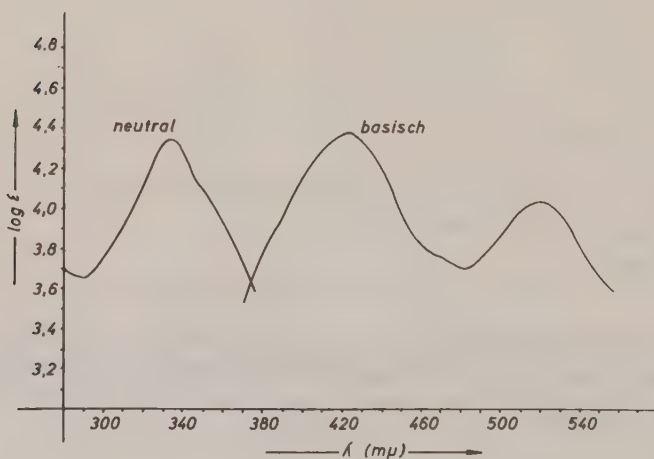


Abb. 28

UV-Spektrum des Keton-DNPH in neutraler und alkalischer Lösung

Aufgrund der beiden Spektren mußte es sich bei diesem Keton um ein aliphatisches α,β -gesättigtes Keton handeln. Das IR-Spektrum des Ketonhydrazons (Abb. 29) wies keine Banden auf, die auf einen ungesättigten Charakter der Substanz hätte schließen lassen. Dem Spektrum zufolge war keine Isopropylverzweigung vorhanden. Die NH-Valenzschwingung bei 3322 cm^{-1} lag in dem für Ketonhydrazone typischen Bereich. Die aliphatische Valenzschwingungsbande befand sich bei 2950 cm^{-1} . Im Gegensatz zu den bisher von uns IR-spektroskopisch untersuchten 2,4-Dinitrophenylhydrazonen wies das Spektrum Banden bei $1020, 896, 877$ und 810 cm^{-1} auf, die wir nicht zuordnen konnten.

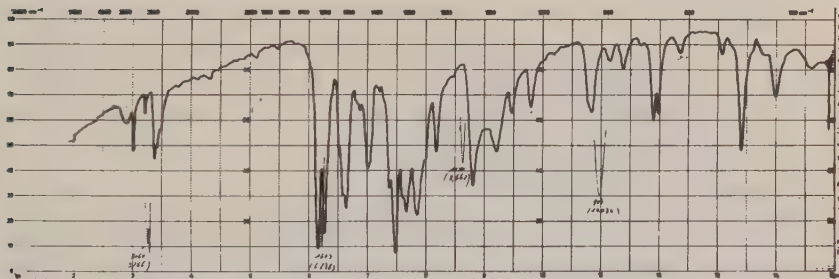


Abb. 29

IR-Spektrum des Keton-DNPH

Auf Grund des dünn-schichtchromatographischen Verhaltens des Hydrazons konnte es sich aber nicht um ein übliches aliphatisches geradkettiges Ketonhydrazon handeln. Auf Grund seines adsorptionschromatographischen Verhaltens mußte man eine Kohlenstoffzahl von etwa 12 bis 13 annehmen. Verteilungschromatographisch deutete die Lage des R_f -Wertes allerdings nur auf eine Kohlenstoffzahl von 8 bis 9 hin. Ein ähnliches chromatographisches Verhalten fanden wir bei dem 2,4-Dinitrophenylhydrazon des 2-Äthyl-

hexanals. Auch hier sprach der adsorptionschromatographisch erhaltene R_f -Wert für eine längere Kohlenstoffkette als man verteilungschromatographisch hätte vermuten müssen.

IV. Untersuchung der Fraktion der primären Alkohole

1. Abtrennung der primären Alkohole

Die bei der Voruntersuchung im Lindenblütenöl nachgewiesenen primären Alkohole trennten wir durch Phthalisierung mit Phthalsäureanhydrid von den übrigen Bestandteilen des Öls ab. Nachdem von STEPHAN⁵⁴⁾ festgestellt worden war, daß Phthalsäureanhydrid mit p r i m ä r e n Alkoholen bei Wasserbadtemperatur, mit s e k u n d ä r e n Alkoholen meist erst bei höherer Temperatur ohne Lösungsmittel oder in höhersiedenden Lösungsmitteln, mit t e r t i ä r e n Alkoholen dagegen überhaupt nicht reagiert, wurde das Verfahren zur Trennung der Alkoholgruppen und zur präparativen Herausarbeitung primärer und sekundärer Alkohole vielfach verwendet⁵⁵⁾⁵⁶⁾.

Während die älteren Phthalisierungsverfahren in benzolischer Lösung oder ohne Lösungsmittel durchgeführt wurden, hat man in neuerer Zeit, vor allem für empfindliche Alkohole, die Phthalisierung in Pyridin empfohlen⁵⁷⁾. Wir verwendeten die später von GLICHITSCH und NAVES⁵⁸⁾ erarbeitete Vorschrift zur quantitativen Bestimmung der primären Alkohole, nach der die Phthalisierung in Pyridin bei Zimmertemperatur ausgeführt wird und modifizierten sie für präparative Zwecke.

Wir erhielten durch Umsetzen des ätherischen Lindenblütenöls mit Phthalsäureanhydrid und Verseifen der erhaltenen sauren Phthalsäureester 0.7 g primäre Alkohole.

2. Gaschromatographie der primären Alkohole

Die Fraktion der primären Alkohole trennten wir gaschromatographisch an zwei Polyester-Säulen (LAC 1R 296 und Diäthylenglykolsuccinatpolyester) bei einer Temperatur von 140°C (Abb. 30, 31). Diese Fraktion stellte ein kompliziert zusammengesetztes Gemisch dar, das auf der Lac-Säule in annähernd 28 Peaks und auf der zweiten Polyester-Säule in etwa 20 Peaks aufgelöst wurde.

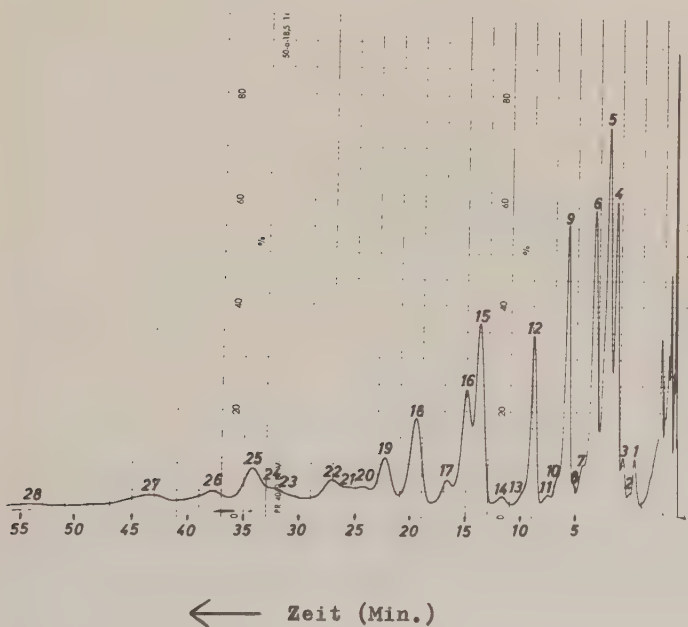


Abb. 30

Gaschromatogramm der primären Alkohole

Säule: 2.4 m x 4 mm, LAC 1R 296 auf Kieselgur (0.1-0.2 mm) 20%
Temperatur: 140°C

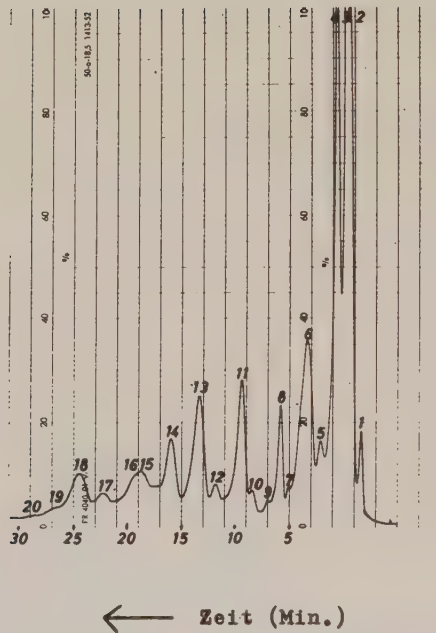


Abb. 31

Gaschromatogramm der primären Alkohole

Säule: 2.4 m x 4 mm, Diäthylenglykolsuccinatpolyester auf
Kieselgur (0.1-0.2 mm) 20%

Temperatur: 140°C

Wir nummerierten die einzelnen Substanzpeaks durchlaufend für jede Säule getrennt und bestimmten für jeden Peak das auf n-Octanol (1) bezogene relative Retentionsvolumen. Beim Vergleich mit Testsubstanzen stimmten n - H e p - t a n o l und n - O c t a n o l auf beiden Säulen mit den entsprechenden Peaks überein, und zwar entsprach

n-Heptanol Peak 9 auf der LAC-Säule (Abb. 30, S.52) und Peak 6 auf der Diäthylenglykolsuccinatpolyester-Säule (Abb. 31, S.53), während n-Octanol mit Peak 12 (LAC)(Abb. 30) und Peak 8 (Diäthylenglykolsuccinatpolyester) (Abb. 31) Identität zeigte.

3. Säulenchromatographische Trennung der primären Alkohole

Da wir auf gaschromatographischem Wege nur wenig Aufschluß über die Zusammensetzung der Fraktion der primären Alkohole erhielten, versuchten wir aus dieser Fraktion durch Säulenchromatographie reine Substanzen zu isolieren. Zu diesem Zwecke führten wir die gesamten Alkohole nach REICHSTEIN⁵⁹⁾ in die entsprechenden 3,5-Dinitrobenzoate (DNB) über. Die DNB wurden von CLAVET und MONTES⁶⁰⁾ an Kieselgel mit Benzin-Äther-Gemischen chromatographiert.

Wir trennten die DNB der primären Alkohole ebenfalls an Kieselgel unter dünnschichtchromatographischer Überprüfung der einzelnen Fraktionen. Auf Grund der geringen Substanzmenge erhielten wir aber in keinem Fall die zur Identifizierung notwendigen Mengen an reiner Substanz.

4. Untersuchung der primären Alkohol-Fraktion auf Farnesol

Nach HAARMANN und REIMER³⁾ sowie KERSCHBAUM⁶¹⁾ soll im ätherischen Öl der Lindenblüten Farnesol enthalten sein. In später erschienenen Lehr- und Handbüchern⁶²⁾⁶³⁾⁶⁴⁾ wird sogar Farnesol als Hauptinhaltsstoff des Lindenblütenöls genannt.

Wir versuchten zunächst das Farnesol dünnschichtchromatographisch nachzuweisen. Dazu verwendeten wir die entsprechenden DNB-Derivate, da sich diese im Gegensatz zu freien Alkoholen chromatographisch exakter erfassen lassen. Wir trennten zunächst die DNB der Alkohol-Fraktion adsorptionschromatographisch an Kieselgel-Schichten mit Hexan/Äther 9:1 als Fließmittel und isolierten die

DNB-Zone in Höhe des Farnesol-DNB. Anschließend chromatographierten wir die genannte Zone verteilungschromatographisch an mit Paraffin imprägnierten Kieselgel-Schichten im System Dimethylformamid/Methanol/Wasser 4:1:1.

Adsorptionschromatographisch trennt sich das Farnesol-DNB nicht von den entsprechenden Derivaten der Monoterpenalkohole. Im Gegensatz dazu besteht verteilungschromatographisch ein deutlicher Unterschied in den R_f -Werten bei den Monoterpenalkoholen einerseits und den Sesquiterpenalkoholen andererseits.

Die auf der adsorptionschromatographischen Platte in der Höhe des Farnesol-DNB isolierte Zone erwies sich verteilungschromatographisch als Monoterpenalkohol.

Somit war dünnschichtchromatographisch in der primären Alkohol-Fraktion des Lindenblütenöls kein Farnesol nachweisbar.

Zur Sicherung des dünnschichtchromatographischen Befundes untersuchten wir die primären Alkohole auch g a s c h r o - m a t o g r a p h i s c h . Zu diesem Zwecke chromatographierten wir die Alkohole auf einer Apiezon L bzw. Reoplex 400-Säule bei einer Temperatur von 180°C bzw. 205°C. im Vergleich zu Farnesol.

In keinem Fall konnten wir in dieser Fraktion Farnesol nachweisen. Ebensowenig war es möglich, wie im Kapitel Ester (S. 56) gezeigt wurde, Farnesol-Ester nachzuweisen.

Somit muß die Anwesenheit dieses Alkohols im Lindenblütenöl angezweifelt werden. Zumindest kann von Farnesol als Hauptbestandteil des ätherischen Öls keine Rede sein.

V. Untersuchung der Ester-Fraktion

1. Abtrennung der Ester

Zur Isolierung der Esterbestandteile des Lindenblütenöls gingen wir von der Fraktion aus, die tertiären Alkohole und Ester im Gemisch enthielt. Auf Grund des beträchtlichen DK-Wert-Unterschiedes zwischen den Alkoholen und Estern, lassen sich die Ester adsorptionschromatographisch gut von den Alkoholen abtrennen. Wir benutzten zur Trennung Kieselgel und Chloroform p.a. als Elutionsmittel. Das Chloroform-Eluat unterteilten wir in 10 Fraktionen zu 50 ml. Jede Fraktion prüften wir nach dem Eindampfen auf die Anwesenheit von Estern mit dem Hydroxylamin-Test⁶⁵⁾. Zur Rückgewinnung der in der Säule verbliebenen tertiären Alkohole eluierten wir mit Äther.

2. Untersuchung der Esterfraktion auf Farnesol

Nachdem wir das von HAARMANN und REIMER³⁾ sowie von KERSCHBAUM⁶¹⁾⁶⁶⁾ im Lindenblütenöl nachgewiesene Farnesol in der primären Alkohol-Fraktion nicht auffinden konnten, bestand die Möglichkeit, daß dieses als Ester gebunden vorlag. Wir verseiften daher einen kleinen Teil der Ester/Alkohol-Fraktion zu den entsprechenden Alkoholen und trennten aus diesen durch Phthalisieren in der Kälte die primären Alkohol-Anteile ab, in denen das Farnesol als primärer Alkohol vorliegen müßte. Die auf diese Weise erhaltene Fraktion wurde analog der Fraktion der primären Alkohole gaschromatographisch untersucht. Es ließ sich kein Farnesol nachweisen.

3. Isolierung und Identifizierung des Esters E1

Die unter 1. erhaltenen 10 Fraktionen mit Ester-Substanzen wurden vereinigt und der Rückstand gaschromatographisch untersucht. Das Gaschromatogramm zeigte neben mehreren

kleinen Peaks, die etwa 10% der Gesamtmenge ausmachten einen Hauptpeak mit der Retentionszeit 5 Min. 3 sec.. Es gelang uns, diese Substanz, die im folgenden mit E1 bezeichnet wird, durch nochmalige Fraktionierung an Kieselgel mit dem Elutionsmittel Chloroform p.a./Benzol 7:3 in 95% Reinheit zu isolieren.

Das IR-Spektrum der Substanz (Abb. 32) zeigte die typischen Merkmale eines Esters. Die Lage der C=O-Valenzschwingung (C=O) bei 1735 cm^{-1} und die der zugehörigen C-O-Valenzschwingung bei 1241 cm^{-1} deuteten auf ein Acetat hin. Die durch CH-Schwingungen verursachten Banden sprachen für einen gesättigten Ester.

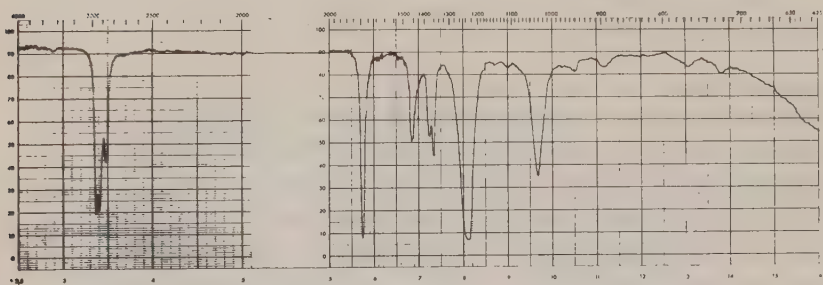


Abb. 32

IR-Spektrum des isolierten
Esters

Zur chromatographischen Identifizierung des Säureanteils des Esters spalteten wir diesen mit alkalischer Hydroxylaminlösung⁹⁾ und untersuchten die entstandene Hydroxamsäure papierchromatographisch im System Amylalkohol/Eisessig/Wasser 4:1:5⁸⁾. Der Hydroxamsäurefleck besaß einen R_f -Wert von 0.33 und stimmte mit Essigsäurehydroxamat überein.

Zur weiteren chemischen Charakterisierung des Säureanteils führten wir die Esterspaltung nach BODROUX⁶⁷⁾ durch. Mit dieser Methode lassen sich Ester durch Einwirkung von Arylaminomagnesiumhalogeniden (in unserem Falle p-Toluidin-Magnesiumbromid) schonend in den zugrunde liegenden freien Alkohol spalten, wobei gleichzeitig das Arylid (Toluidid) aus dem Säureanteil des Esters gebildet wird. Das Reaktionsprodukt untersuchten wir dünnschichtchromatographisch an fluoreszierenden Kieselgel-Schichten mit Chloroform als Laufmittel. Das Toluidid des Säureanteils besaß einen R_f -Wert von 0.09. Der zugehörige Alkohol erschien nach dem Anfärben mit Vanillin-Schwefelsäure bei einem R_f -Wert von 0.33.

Das Toluidid-Alkohol-Gemisch trennten wir an neutralem Aluminiumoxid der Aktivitätsstufe III mit Benzol als Elutionsmittel in den Alkohol und das Toluidid. Das auf diese Weise abgetrennte Toluidid wies nach einmaligem Umkristallisieren aus wässrigem Äthanol einen Schmelzpunkt von 151 - 152°C auf. Der Mischschmelzpunkt mit authentischem Aceto-p-Toluidid zeigte keine Depression. Die IR-Spektren und die CH-Werte stimmten ebenfalls überein (Abb. 33, S.59). Damit war Essigsäure als Säurekomponente des Esters bewiesen.

Die Bodroux-Spaltung lieferte einen gaschromatographisch reinen Alkohol mit einer Dichte von $D_4^{20} = 0.8332$ und einem Brechungsindex von $n_D^{20} = 1.4335$. Die Retentionszeiten des Alkohols lagen zwischen denen von n-Heptanol (1) und n-Octanol (1).

Da sich zur Charakterisierung des Alkohols das 3,5-Dinitrobenzoat nicht eignete, setzten wir den Alkohol mit 4'-Nitro-azobenzolcarbonsäure-(4)-chlorid⁶⁸⁾⁶⁹⁾ zum NABS-Ester um.

Dieses Reagenz hat sich zur Identifizierung und Äquivalentgewichtsbestimmung von Alkoholen vielfach bewährt⁷⁰⁻⁷³⁾.

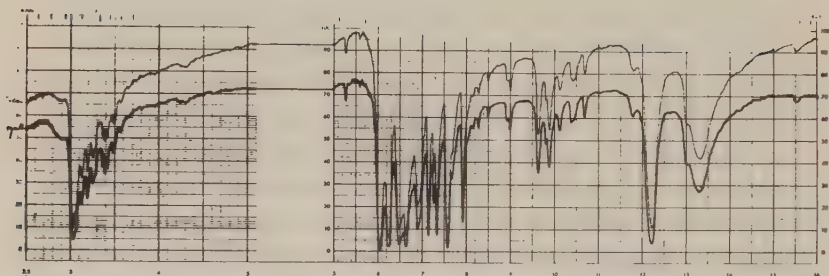


Abb. 33

IR-Überlagerungsspektrum von authentischem Aceto-p-toluidid und dem aus dem Säureanteil des Esters erhaltenen Toluidids

Der NABS-Ester kristallisierte aus Heptan in rotorangen Plättchen vom Schmelzpunkt $99 - 100^{\circ}\text{C}$. Das UV-spektrophotometrisch bestimmte Molekulargewicht des NABS-Esters wurde zu 379.5 gefunden. Im Verein mit den CH-Werten deutete dies auf einen Alkohol mit 8 C-Atomen. Die Methylgruppenbestimmung des NABS-Esters nach KUHN und ROTH⁷⁴⁾ lieferte 2 Mol Essigsäure, was auf zwei endständige Methylgruppen hinwies und damit eine Verzweigung wahrscheinlich machte.

Die anschließende Chromsäureoxydation des Alkohols ergab eine Carbonylverbindung, die mit dem Aldehyd-Reagenz Fuchsin-schweiflige Säure positiv reagierte. Wir erhielten daraus ein Semicarbazon, das nach Reinigung an Aluminiumoxid und einmaligem Umkristallisieren aus wässrigen Äthanol bei 253°C unter Zersetzung schmolz. Das Semicarbazon führten wir direkt nach NAVES⁷⁵⁾ in das entsprechende 2,4-Dinitrophenylhydrazon, das nach Reinigung an Aluminiumoxid und einmaligem Umkristallisieren aus 95%igem Äthanol einen Schmelzpunkt von 126°C aufwies. Das UV-Hauptmaximum (339 m μ Hexan) dieses Hydrazons zeigte einen gesättigten

Aldehyd an. Als weiterer Beweis für die Aldehydgruppe diente die Oxydation mit Silberoxid⁴²⁾ zur Carbonsäure, die wir in Form des Methylesters gaschromatographisch nachweisen konnten.

Somit konnten wir eindeutig beweisen, daß es sich bei dem dem Ester zugrunde liegenden Alkohol um einen verzweigten primären Alkohol mit 8 C-Atomen handelte.

Die Schmelzpunkte des Semicarbazons (253°C) und des 2,4-Dinitrophenylhydrazons (126°) paßten gut auf die entsprechenden Derivate des 2-Äthylhexanals, dessen Semicarbazon-Schmelzpunkt mit 254°C und dessen DNPH-Schmelzpunkt mit $120 - 121^{\circ}\text{C}$ in der Literatur angegeben ist⁵²⁾.

Wir verglichen deshalb das DNPH mit authentischem 2-Äthylhexanal-DNPH, wobei Mischschmelzpunkt und CH-Werte übereinstimmten. Dem isolierten Ester kommt somit die Struktur eines 2 - Ä t h y l h e x a n o l (1) - A c e t a t s zu. Diese Substanz ist unseres Wissens bisher in ätherischen Ölen noch nicht aufgefunden worden.

VI. Untersuchung der Fraktion der tertiären Alkohole

1. Dünnschichtchromatographie der 3,5-Dinitrobenzoate (DNE)

Die Gewinnung der tertiären Alkohole wurde im Kapitel V. 1. beschrieben.

Zur dünnschichtchromatographischen Untersuchung wurden diese in die 3,5-Dinitrobenzoate überführt und an Kieselgel-Schichten im System Hexan/Äther 9:1 chromatographiert. Wie aus folgendem Chromatogrammschema (Abb. 34, S.61) zu entnehmen ist, waren im wesentlichen 6 Alkohole nachweisbar, von denen der Alkohol bei R_f -Wert 0.34 mengenmäßig zu überwiegen schien. Der chromatographische Vergleich mit 3,5-Dinitrobenzoaten von Testsubstanzen ergab, daß die Alkohole 6 bzw. 4 mit 4-Terpinenol bzw. Linalool übereinstimmten.

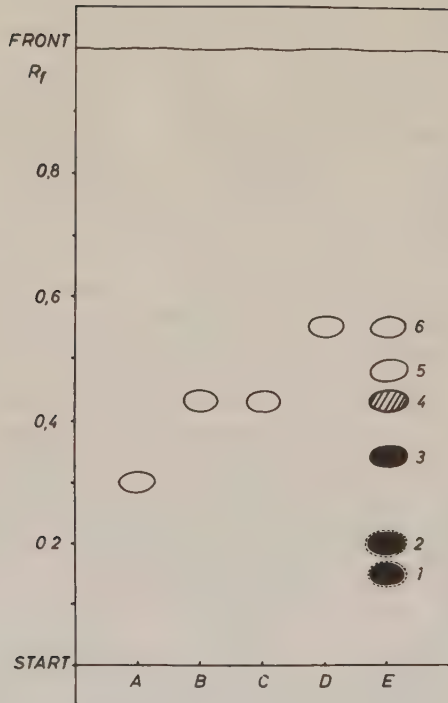


Abb. 34

Schema des Dünnschichtchromatogramms der tert. Alkohol-DNB des Lindenblütenöls

Adsorbens: Kieselgel GF₂₅₄

Fließmittel: Hexan/Äther (9:1)

Nachweis: UV-Licht (254 mμ)

A = Buttergelb

B = Linalool-DNB

C = α-Terpineol-DNB

D = 4-Terpinenol-DNB

E = tert. Alkohol-DNB des Lindenblütenöls

2. Gaschromatographische Untersuchung

Die gaschromatographische Analyse der Fraktion der tertiären Alkohole erfolgte auf einer polaren (EGSS-I) und auf einer unpolaren Säule (Apiezon L). Wie aus den Abbildungen der beiden Gaschromatogramme (Abb. 35 und 36) hervorgeht, trennte die polare Säule das Alkohol-Gemisch in annähernd 12 Substanzen auf, während auf der unpolaren Säule etwa 11 Stoffe nachzuweisen waren.

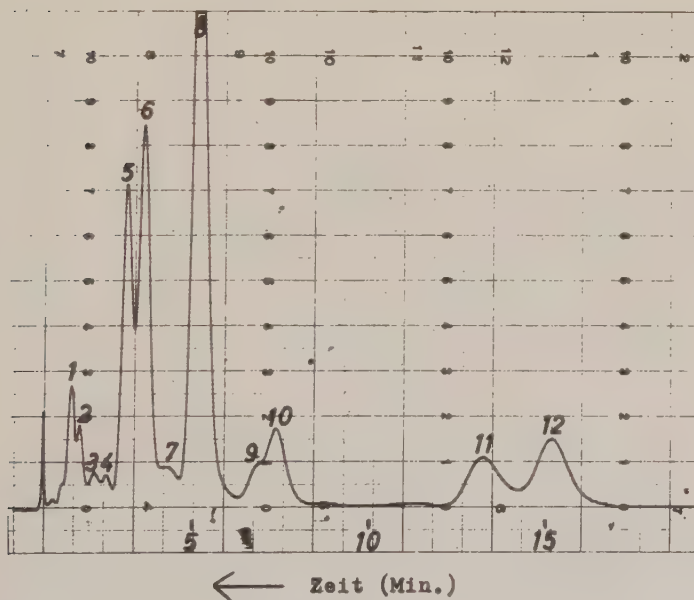


Abb. 35

Gaschromatogramm der tertiären Alkohole

Säule: 2 m x 4 mm, EGSS-I auf Gaschrom P (100-120 mesh) 15%
Temperatur: 134°C

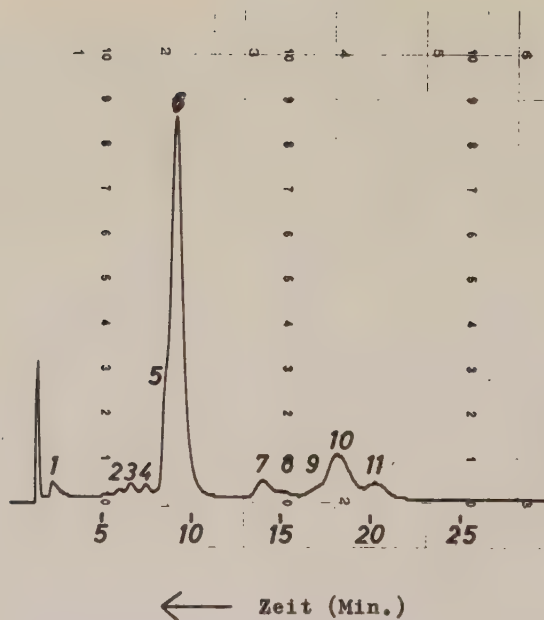


Abb. 36

Gaschromatogramm der tertiären Alkohole

Säule: 2 m x 4 mm, Apiezon L auf Chromosorb WS (45-60 mesh) 16%
Temperatur: 134°C

Die Alkohole Linalool und 4-Terpinenol, die wir auf Grund der dünnschichtchromatographischen Untersuchung vermuteten, ließen sich auch gaschromatographisch bestätigen. Linalool entsprach Peak 6 auf der Polyester-Säule. Auf der Apiezon-säule fiel Linalool mit weiteren Substanzen in dem Haupt-peak 6 zusammen. 4-Terpinenol war auf der Polyester-Säule nicht eindeutig nachzuweisen, da dieser Alkohol mit der Hauptschubstanz der Alkoholfraktion (Peak 8) zusammenfiel.

Dagegen ließ sich 4-Terpinenol auf der Apiezon-Säule nachweisen und entsprach Peak 10. Außerdem ließen beide Gaschromatogramme das Vorhandensein von α -Terpineol vermuten, und zwar entsprach α -Terpineol Peak 10 der Polyester-Säule und Peak 11 der Apiezon-Säule. Die Hauptschubstanz der Alkohol-Fraktion (Peak 8, EGSS-X) machte den Hauptteil des Peak 6 der Apiezon-Säule aus. Ebenso fielen die beiden Alkohole, die mit Peak 11 und 12 der Polyester-Säule identisch waren mit Peak 6 der Apiezon-Säule zusammen.

3. Säulenchromatographische Fraktionierung der 3,5-Dinitrobenzoate an Kieselgel

Zur Isolierung einzelner tertiärer Alkohole aus dem Gemisch wurden diese in Form ihrer DNB an fluoreszierendem Kieselgel (60) chromatographiert. Als Elutionsmittel diente bis zur 35. Fraktion Benzin/Äther 98:2 und anschließend Äther. Wir gewannen insgesamt 50 Fraktionen zu 25 ml. Den Verlauf der Fraktionierung verfolgten wir an Kieselgelschichten im System Hexan/Äther 9:1. Zur weiteren Untersuchung gelangten die Fraktionen 4 mit 5, 11 mit 15, 21 mit 25, 26 mit 32 und 42 mit 50.

4. Untersuchung der Fraktion 4 mit 5

Die Fraktion 4 mit 5 war dünnschichtchromatographisch einheitlich und stellte ein zähes gelbes Öl dar, das aus Benzin in gelblichweißen Plättchen vom Schmelzpunkt 120 - 122°C kristallisierte. Das IR-Überlagerungsspektrum (Abb.37), Mischschmelzpunkt und CH-Werte zeigten mit authentischem 4-Terpinenol-DNB Übereinstimmung.

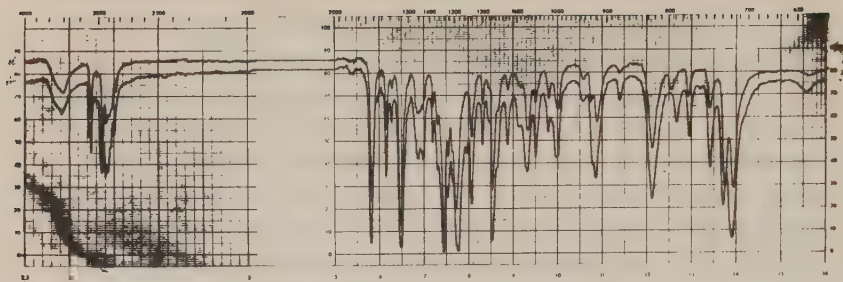


Abb. 37

IR-Überlagerungsspektrum von isoliertem und authentischem
4-Terpinenol-DNB

6. Untersuchung der Fraktion 11 mit 15

Die Fraktion 11 mit 15 war dünnschichtchromatographisch einheitlich. Sie stellte ein zähes gelbes Öl dar, das nicht zu kristallisieren war.

Die gaschromatographische Analyse der verseiften Fraktion an einer Apiezon-Säule ergab, daß die Fraktion aus einem Gemisch von etwa 65% Linalool, 25% α -Terpineol und 10% eines nicht identifizierbaren Alkohols bestand.

Die Trennung von Linalool und α -Terpineol aus der verseiften Fraktion gelang an Kieselgel mit Benzin/Äther 9:1 als Elutionsmittel. Das Eluat wurde in 30 Fraktionen zu 10 ml unterteilt. Den Verlauf der Fraktionierung verfolgten wir dünnschichtchromatographisch an Kieselgel-Schichten im System Benzin/Äther 1:1. Die Fraktionen 9 mit 18 enthielten gaschromatographisch nahezu reines Linalool. Einheitliches α -Terpineol fand sich in den Fraktionen 25 mit 30 vor.

Das auf diese Weise isolierte Linalool wurde in Form des p-Nitrobenzoates (NB) charakterisiert, das nach zweimali-

gem Umkristallisieren aus Methanol p.a. einen Schmelzpunkt von $75 - 76^{\circ}\text{C}$ aufwies. DOLL⁷⁶⁾ fand für die d- und l-Form des Linalools einen Schmelzpunkt von $74 - 75^{\circ}\text{C}$. Das IR-Überlagerungsspektrum (Abb. 38) stimmte mit authentischem Linalool-NB überein. Der Mischschmelzpunkt mit l-Linalool-NB zeigte keine Depression.

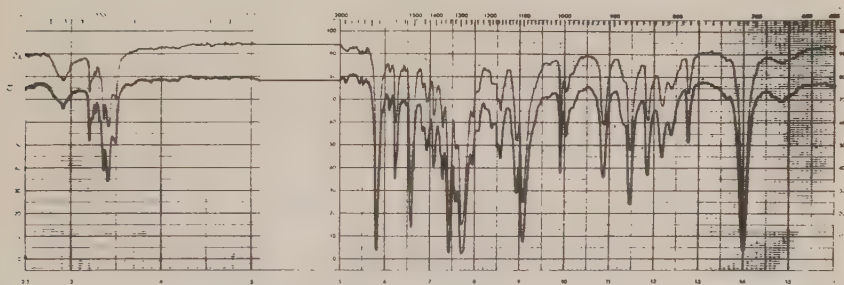


Abb. 38

IR-Überlagerungsspektrum von isoliertem und authentischem
Linalool-NB

Das säulenchromatographisch isolierte α -Terpineol wurde zum 3,5-Dinitrobenzoat umgesetzt, das nach Umkristallisieren aus Benzin und Methanol p.a. weiße Nadelchen vom Schmelzpunkt 100°C lieferte. Das IR-Überlagerungsspektrum (Abb. 39), sowie die CH-Werte stimmten mit authentischem α -Terpineol-DNB überein. Der Mischschmelzpunkt mit l- α -Terpineol-DNB zeigte keine Depression.

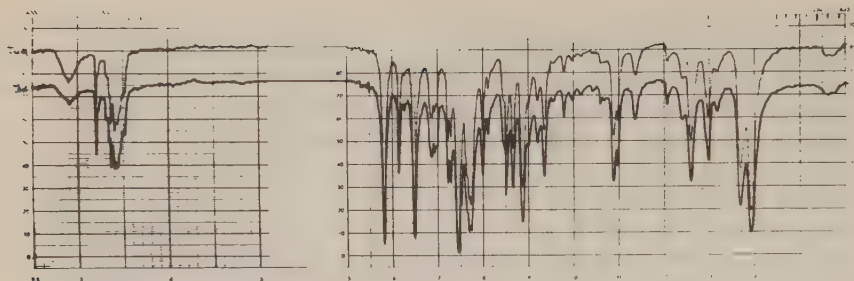


Abb. 39

IR-Überlagerungsspektrum von isoliertem und authentischem
 α -Terpineol-DNB

7. Untersuchung der Fraktion 21 mit 32

Die Fraktion 21 mit 32 enthielt die Haupts substanz der Fraktion der tertiären Alkohole. Sie war identisch mit Fleck 3 des Dünnschichtchromatogramms (Abb. 34, S.61). Der aus dem 3,5-Dinitrobenzoat durch Verseifung erhaltene freie Alkohol war durch Peak 8 der Polyester-Säule und Peak 6 der Apiezon-Säule charakterisiert. Dünnschichtchromatographisch lag der Alkohol bei einem R_f -Wert von 0.53 (Benzin/Äther 1:1) und 0.29 (Benzol/Äthylacetat 95:5).

Zur weiteren Identifizierung des Alkohols zogen wir das IR-(Abb. 40) und das UV-Spektrum heran. Die OH-Valenzschwingung bei 3413 cm^{-1} und die Bande bei 1111 cm^{-1} (Kopplung der OH-Deformationsschwingung mit der C-O-Valenzschwingung) deuteten, im Verein mit der Frequenzänderung der Kopplungsbande des hydrierten Alkohols nach 1155 cm^{-1} , auf einen tertiären Alkohol hin, der in α -Stellung zur OH-Gruppe eine Doppelbindung enthielt. Für eine Vinylgruppierung sprachen die Banden bei 3086 , 1642 und 920 cm^{-1} . Weiter trat bei 965 cm^{-1} eine starke Bande auf, die einer trans-Doppelbindung zuzuordnen war. Auf

Grund der Bande bei 1610 cm^{-1} war eine Konjugation der Vinylgruppe zu einer zweiten Doppelbindung anzunehmen.

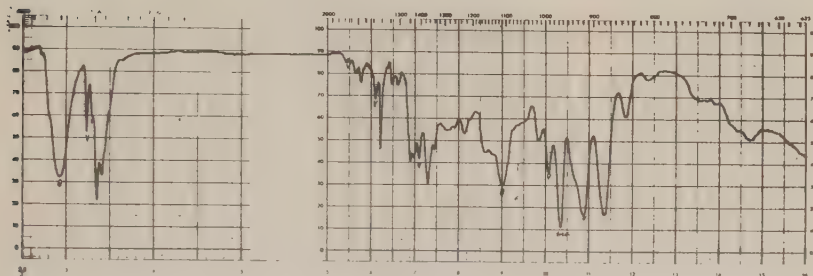


Abb. 40

IR-Spektrum des tertiären Alkohols Peak 8 (EGSS-I)

Das UV-Absorptionsmaximum des Alkohols bei $230\text{ m}\mu$ mit einem molaren Extinktionskoeffizienten von $\epsilon = 17050$ sprach ebenfalls für einen Alkohol mit konjugierter Doppelbindung, für den nach der WOODWARD-Regel^{77)78)*)} eine Struktur eines offenkettigen Diens oder eines Ringdiens mit exocyclischer Doppelbindung wahrscheinlich wäre.

Zur Ermittlung des Grundgerüsts des Alkohols hydrierten wir diesen am Palladium-Tierkohle-Kontakt. Das Hydrierungs-Produkt zeigte gaschromatographisch Identität mit Tetrahydrolinalool. Ebenso stimmte das DNB des Hydrierungsproduktes nach chromatographischer Reinigung an Kieselgel in IR-Spektrum und Mischschmelzpunkt mit authentischem Tetrahydrolinalool-DNB überein (Abb. 41, S.69).

Mit Tetrahydrolinalool als Grundstruktur des Alkohols lassen sich allerdings die aus dem IR-Spektrum abgeleitete Vinylgruppierung und die aus dem UV-Spektrum erhaltene Dienstruktur des Alkohols nicht in Einklang bringen.

*) Nach der WOODWARD-Regel geht man von der Absorptionsbande des unsubstituierten Diensystems aus, die mit $214\text{ m}\mu$ angenommen wird. Für jeden Alkylsubstituenten beträgt die bathochrome Verschiebung $5\text{ m}\mu$ und für jede Doppelbindung, die exocyclisch an einem Ring sitzt, weitere $5\text{ m}\mu$. Handelt es sich um ein homoannulares Dien, d.h. liegen zwei Doppelbindungen in einem Ring, so sind hierfür $39\text{ m}\mu$ hinzuzufügen.

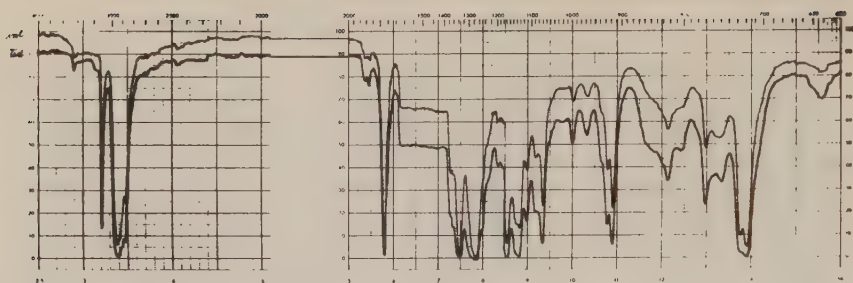


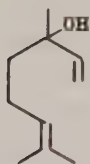
Abb. 41

IR-Überlagerungsspektrum vom DNB des Hydrierungsproduktes mit
Tetrahydrolinalool-DNB

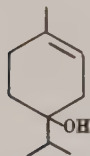
8. Untersuchung der Fraktion 42 mit 50

Die Fraktion 42 mit 50 bestand dünnenschichtchromatographisch aus den beiden Substanzen 5 und 6 (Abb. 34, S.61). Die durch Verseifung der 3,5-Dinitrobenzoate erhaltenen freien Alkohole waren identisch mit Peak 11 und 12 der Polyester-Säule. Nähere Untersuchungen wurden bisher nicht angestellt.

Formelübersicht



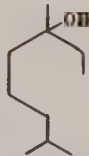
Linalool



4-Terpinenol



α -Terpineol



Tetrahydrolinalool

EXPERIMENTELLER TEIL (Lindenblütenöl)

I. Chromatographische Untersuchungen

1. Dünnschicht- und Papierchromatographie

Dünnschichtchromatographie :

Die verwendeten Glasplatten besaßen eine Größe von 20 x 12 cm. Als Adsorbens diente Kieselgel G und Kiesel GF₂₅₄ Merck. Zum Bestreichen von 4 Glasplatten wurden 16 g Adsorbens mit 32 ml Wasser angeschlämmt und mit Hilfe eines Streichgerätes auf die Platten verteilt. Die Aktivierung der Platten erfolgte im Trockenschrank bei 120°C.

Paraffinimprägnierte Platten wurden durch aufsteigende Chromatographie einer 10%igen Lösung von Paraffin flüssig in Petroläther (v/v) hergestellt.

Auf jedes Chromatogramm wurde Buttergelb als Bezugssubstanz aufgetragen. Bei Verwendung von Hexan als Fließmittel (Terpenkohlenwasserstoffe) diente Azulen (Dragoco-Holzminde/Weser) als Testfarbstoff.

Als Kammern dienten Weckgläser mit einer Höhe von 26 cm und einem Durchmesser von 15 cm, die mit Glasplatten abgedeckt wurden.

Papierchromatographie :

An Papieren wurden verwendet 2043 bMgl und 2043 b acetyliert (20 - 25% Acetyl) der Firma Schleicher und Schüll, Dassel/Einbeck.

Die Substanzen wurden in 2 cm langen Strichen aufgetragen. Die Entwicklung der Chromatogramme erfolgte aufsteigend über 25 - 30 cm. Die Laufzeiten betrugen 12 Std. für das Fließmittel Äthylacetat/Tetrahydrofuran/Wasser 12:70:94 und 18 Std. für das Amylalkohol/Eisessig/Wasser 4:1:5-Gemisch bei 20°C.

2. Säulenchromatographie

An Adsorbentien wurden verwendet: Aluminiumoxid neutral der Firma Woelm/Eschwege Aktivitätsstufe I aus dem durch Zumischen von Wasser die benötigten Aktivitätsstufen erhalten wurden⁷⁸⁾.

Kieselgel Merck der Korngröße 0.2 - 0.5 mm und 0.05 - 0.2 mm. Zur Trennung der 3,5-Dinitrobenzoate wurde fluo-reszierendes Kieselgel verwendet, das aus Kieselgel 0.05 - 0.2 mm Merck mit Rhodamin 6G (Britisch Drug House) nach WHITE und DRYDEN⁷⁹⁾ hergestellt wurde.

Die Füllung der Säulen erfolgte durch langsames Einschütten des Adsorbens in die in der Röhre befindliche Flüssigkeit. Bei einem Elutionsmittel-Gemisch wurde der weniger polare Teil des Gemisches zum Einschlänmen benutzt.

3. Gaschromatographie

G a s c h r o m a t o g r a p h e n :

- a) Gasofract 300 B mit Thermosistoren-Wärmeleitfähigkeitsmeßzelle, Thermostat und Philipps-Kompensationsschreiber. Hersteller: Dr. Virus KG, Bonn.
- b) Packard-Gaschromatograph vom Typ 7500 mit β -Strahlen-argon-Ionisationsdetektor und Honeywell-Kompensationsschreiber vom Typ Elektronik 17. Hersteller: Packard Instrument Company, Inc., La Grange, Illinois (USA).

S ä u l e n m a t e r i a l :

- a) Kupferrohre von 4 mm innerem Durchmesser, die mit Hermetoverschlüssen versehen waren (Virus-Gaschromatograph).
- b) Spiralig gebogene Glassäulen von 4 mm innerem Durchmesser. (Packard-Gaschromatograph). Als Anschlüsse dienten Silicon-Gummistopfen mit Teflonschläuchen.
- c) V₂A-Stahl-Säulensatz mit 1.8 cm innerem Durchmesser für präparative Gaschromatographie.

Trä g e r g a s e :

Elektrolyt-Wasserstoff, nachgereinigter Stickstoff (Gasofract) und Spezialargon (Packard). Die Gase wurden von Fa. Linde AG, München, bezogen.

F l ü s s i g e P h a s e n :

Apiezon L	Dr.Theodor Schuchardt GmbH, München
Reoplex 400	E.Merck AG, Darmstadt
Dinonylphthalat	E.Merck AG, Darmstadt
LAC 1R 296	Dr.Theodor Schuchardt GmbH, München
β,β -Oxydipropionitril	Dr.Theodor Schuchardt GmbH, München
Diäthylenglykolsuccinat- polyester	C.Roth, Karlsruhe
Polyäthylenglykol 4000	Dr.Theodor Schuchardt GmbH, München
EGSS-X	Applied Science Laboratories, Inc., State College, USA

T r ä g e r m a t e r i a l i e n :

Kieselgur 0.1 - 0.2 mm	E.Merck AG, Darmstadt
Chromosorb WS 45-60 mesh	Dr.Theodor Schuchardt GmbH, München
Gaschrom P 100-120 mesh	Applied Science Laboratories, Inc., State College, USA (Ver- trieb für Deutschland: Serva, Heidelberg)

I m p r ä g n i e r u n g d e s T r ä g e r m a t e -
r i a l s : Das Trägermaterial wurde zunächst mit "statio-
närer Phase" (zwischen 15 und 20%), die in Methylenchlorid
gelöst war, zu einem Brei verrührt. Darauf wurde das Lösungs-
mittel unter vorsichtigem Rühren der Masse auf dem Dampfbad
entfernt. Zur vollständigen Entfernung des Lösungsmittels
wurde das imprägnierte Trägermaterial in dünner Schicht
24 Std. im Vakuumtrockenschrank bei 100°C und 600 Torr er-
hitzt. Das in die Säule gefüllte Material wurde 2 Tage unter
Gasdurchfluß bei einer Temperatur, die 10% über der Betriebs-
temperatur der Säule lag, konditioniert.

A u f f a n g e n d e r F r a k t i o n e n :

Dazu diente ein Fraktionssammler der Firma Dr.Virus KG, Bonn, der durch eine heizbare Verbindungsleitung an den Gasausströmungsstutzen angeschlossen wird. Um zu frühe Kondensation der aufzufangenden Substanzen zu verhindern, wurde die Temperatur des Verbindungsstückes um 10% höher als die Säulentemperatur gehalten. Die Auffanggefäße stellten zweischenklige U-förmig gebogene Röhrchen dar, die mit zwei in der Mitte durchbohren Siliconstopfen verschlossen waren. Als Kühlmittel diente Wasser von 8-10°C.

II. Physikalisch-chemische Untersuchungen

Ein Teil der m i k r o a n a l y t i s c h e n B e -
s t i m m u n g e n wurde im Mikroanalytischen Laborato-
rium A.Bernhardt, Max-Planck-Institut für Kohlenforschung
durchgeführt. Die übrigen Bestimmungen erfolgten im mikro-
analytischen Laboratorium des Instituts.

Die I n f r a r o t s p e k t r e n wurden teilweise im
Institut für organische Chemie der Universität München mit
dem Perkin-Elmer-Infrarotspektrophotometer Nr. 224 bzw. mit
dem Infrarotspektrophotometer der Ernst Leitz GmbH, Wetzlar,
gemessen^{*)}. Die übrigen Spektren wurden auf einem Beckman-
Infrarotspektrophotometer IR 8 gefahren.

Feste Proben wurden als KBr-Preßlinge, flüssige Proben wur-
den entweder in Schwefelkohlenstoff (Uvasol, Merck) oder als
Film zwischen NaCl-Plättchen bestimmt.

Die U l t r a v i o l e t t s p e k t r e n bestimmten
wir auf dem Zeiss-Opton Spektrophotometer PMQ. Als Lösungs-
mittel dienten Äthanol 95%, Isooctan und Chloroform (Uvasol
Merck).

Die genau gewogenen Substanzen (1 - 2 mg) wurden in 100 ml
Lösungsmittel gelöst und die Extinktion in Quarzküvetten bei
einer Schichtdicke von 1 cm gemessen. Die Maxima sind in

*) Wir danken dem physikal.Labor des Org.-Chem.Instituts der
Universität München (Direktor: Professor Dr.R.Huisgen) für
die Aufnahme der IR-Spektren.

$\log \xi$ angegeben.

Die Schmelzpunktsbestimmungen erfolgten am Kofler-Heiztisch Nr. 236386 der Firma Reichert, Wien. Alle Werte sind korrigiert.

Die Dichtbestimmung wurde mit einem Pyknometer von 1 ml Fassungsvermögen durchgeführt.

Der Brechungsindex wurde mit einem Abbe-Refraktometer Nr. 1750 der Firma Carl Zeiss, Oberkochen/Württ. bestimmt.

Das optische Drehvermögen des ätherischen Öls wurde an einem Polarimeter Nr. 12989 der Firma Schmid und Haensch, Berlin, versehen mit einer Natriumlampe, bei 20° gemessen. Aus dem im 50 mm-Rohr bei Natriumlicht abgelesenen Drehwinkel α wurde das spezifische Drehvermögen $(\alpha)_D$ nach folgender Formel berechnet:

$$[\alpha]_D = \frac{\alpha}{l \times d}$$

$$\alpha = -17^{\circ}39'$$

$$l = 5 \text{ dm}$$

$$d = 0.921$$

$$[\alpha]_D = -3^{\circ}50'$$

III. Reinigung und Absolutierung der Lösungsmittel

Äther: Zu allen Arbeiten wurde nur peroxidfreier Äther verwendet, der nach DASLER und BAUER⁸⁰⁾ durch Filtrieren über Aluminiumoxid basisch Aktivitätsstufe I (1 Teil Al_2O_3 auf 10 Teile Äther) erhalten wurde.

Benzin: Von Wundbenzin DAB 6 wurden die im Siedebereich von $40 - 60^{\circ}\text{C}$ übergelassenen Anteile gesammelt und über Aluminiumoxid basisch Aktivitätsstufe I filtriert (1 Teil Al_2O_3 auf 1 Teil Benzin).

B e n z o l : Benzol p.a. Merck wurde 2mal über Natriumdraht destilliert.

P y r i d i n : Pyridin für chromatographische Zwecke Merck wurde über Kaliumhydroxidplättchen destilliert.

IV. Gewinnung des ätherischen Öls

150 kg getrocknete Lindenblüten DAB 6 (Fa. Heinrich Unfried, München) wurden der Wasserdampfdestillation unterworfen. Das erhaltene Destillat (750 l) schüttelten wir mit insgesamt 750 l Benzin aus. Nach dem Trocknen der Benzinphase mit Natriumsulfat entfernten wir das Lösungsmittel bei 20°C am Rotationsverdampfer. Um größere Abdampfverluste an ätherischem Öl zu vermeiden, wurde zwischen Kühler und Wasserstrahlsaugpumpe eine Kühlfalle angebracht.
Ausbeute an ätherischem Öl: 21.5 g.

V. Gruppenanalyse des ätherischen Öls

S ä u r e z a h l (S Z) (ISO-Vorschlag 1955)*). In einem Verseifungskolben von 100 ml, der mit einem 1 m langen Glasrohr als Rückflußkühler versehen war, wurden etwa 1 g über Natriumsulfat getrocknetes Öl eingewogen und in 2.5 ml 95%igem Äthanol p.a. aufgelöst. Das Äthanol wurde vor jeder Bestimmung mit 0.1 N äthanolischer Kalilauge gegen Phenolphthalein neutralisiert. Man fügte 2 Tropfen einer neutralen Lösung von 0.2 g Phenolphthalein in 100 ml Äthanol p.a. hinzu und titrierte mit 0.1 N alkoholischer Kalilauge.

Ist m das Gewicht der Ölprobe in Gramm und n die verbrauchte Menge an 0.1 N Laugelösung in ml, so errechnet sich die Säurezahl zu:

$$SZ = \frac{5.61 \cdot n}{m}$$

*) Internationale Organisation für Normung (Generalsekretariat, 39 Roux de Malagnon, Genf, Schweiz)

Bestimmung I

m = 1.05321 g

n = 8.03 ml

SZ = 42.8

Bestimmung II

m = 0.99745 g

n = 7.69 ml

SZ = 43.1

Esterzahl (EZ) (ISO-Vorschlag 1954)*). Zum Inhalt des Verseifungskolbens, in dem die Bestimmung der Säurezahl des ätherischen Öls vorgenommen wurde, fügte man 10 ml 0.5 N alkoholische Kalilauge und Siedesteinchen und erhitze eine Stunde zum Sieden. Nach dem Abkühlen entfernte man das Rückflußrohr, fügte 2 Tropfen alkoholische Phenolphthaleinlösung hinzu und titrierte mit 0.5 N Salzsäure.

Analog führte man jeweils eine Blindprobe aus, indem man 2.5 ml Äthanol und 10 ml 0.5 N alkoholische Kalilauge auf dem Wasserbad kochte und nach dem Abkühlen genauso wie oben mit 0.5 N Salzsäure titrierte.

Ist m das Gewicht des Öls in Gramm, sind n die ml verbrauchter Salzsäure, n_1 die ml Salzsäure des Blindversuches, so errechnet sich die Esterzahl wie folgt:

$$EZ = \frac{28(n_1 - n)}{m}$$

Bestimmung I

m = 1.05321

n_1 = 9.60 ml

n = 5.40 ml

EZ = 111.66

Bestimmung II

m = 0.99745

n_1 = 9.54 ml

n = 5.61 ml

EZ = 110.32

VI. Untersuchung der Säurefraktion

1. Abtrennung der Säuren

20 g Lindenblütenöl, gelöst in 200 ml Petroläther, wurden 3mal mit 50 ml 10%iger wässriger Sodalösung ausgeschüttelt. Nach dem Ansäuern der sodaalkalischen Phase mit 10%iger Schwefelsäure wurde 3mal mit 100 ml Petroläther

*) Internationale Organisation für Normung (Generalsekretariat, 39 Roux de Malagnon, Genf, Schweiz)

(Sp. 40 - 60°C) ausgeschüttelt, die Petrolätherphase mehrmals mit Wasser säurefrei gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und bei Zimmertemperatur im Vakuum eingedampft. Ausbeute: 2.1 g

2. Methylierung der Säuren

150 mg Säuregemisch, gelöst in 10 ml Äther wurden mit einer frisch bereiteten ätherischen Diazomethanlösung⁸¹⁾ im Überschuß versetzt, 30 Min. bei Zimmertemperatur stehen gelassen und das Reaktionsgemisch im Vakuum eingedampft. Ausbeute: 170 mg.

3. Säurehydroxamate

a) Herstellung

Zur Herstellung der Säurehydroxamate wurden folgende Lösungen benötigt: Lösung A: 1 N Hydroxylaminhydrochlorid in Methanol, Lösung B: 1 N Kalilauge in Methanol, Lösung C: Tetrahydrofuran/Eisessig 4:1. Man mischt 1 Vol. Lösung A und 2 Vol. Lösung B und saugt das entstandene KCl ab. Diese Reagenzlösung D hält sich nur wenige Stunden. Etwa 1 mMol Säuremethylester wurden mit 3 ml der Lösung D versetzt und 30 Min. bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Dann neutralisiert man mit Lösung C, wobei pro 3 ml D 0.3 ml C verbraucht werden. Die neutralisierte Lösung wurde auf das Papier aufgetragen.

b) Papierchromatographie

Die Trennung der Hydroxamate erfolgte aufsteigend auf SS 2043 b Mgl und SS 2043 b acetyliert (20 - 25% Acetyl). Als Fließmittelsysteme verwendeten wir Amylalkohol/Eisessig/Wasser 4:1:5 und Äthylacetat/Tetrahydrofuran/Wasser 12:70:94. Die Chromatogramme wurden bei Zimmertemperatur getrocknet und zum Nachweis der Flecken mit einer 2%igen Eisen-III-chloridlösung in Äthanol/Butanol 4:1 besprüht.

4. Gaschromatographie

- a) Säule: 3 m x 4 mm, Reoplex 400 auf Chromosorb WS
(45-60 mesh) 20%

Temperatur: 125°C

Strömungsgeschwindigkeit: 67 ml/Min. H₂

Papiervorschub: 0.5 cm/Min.

Einspritzmenge: 3 µl

Empfindlichkeit: 200 mA/2.5 mV

- b) Säule: 1.2 m x 4 mm, Apiezon L auf Sterchamol
(0.1-0.2 mm) 20% + 3% Natriumcapronat

Temperatur: 125°C

Strömungsgeschwindigkeit: 58 ml/Min. H₂

Papiervorschub: 0.5 cm/Min.

Einspritzmenge: 4 µl

Empfindlichkeit: 200 mA/2.5 mV

- c) Säule: 2 m x 4 mm, Dinonylphthalat auf Sterchamol
(0.1-0.2 mm) 20%

Temperatur: 125°C

Strömungsgeschwindigkeit: 52 ml/Min. H₂

Papiervorschub: 0.5 cm/Min.

Einspritzmenge: 5 µl

Empfindlichkeit: 150 mA/2.5 mV

5. Isolierung der Säuren

- a) Herstellung der Säure-p-phenylphenacylate

100 mg methyliertes Säuregemisch wurden durch 2stündiges Erhitzen am Rückfluß mit methanolischer Kalilauge verseift. Die unverseiften Anteile entfernte man durch 3maliges Ausschütteln mit Petroläther. Nach dem Ansäuern der alkalischen Phase mit 10%iger Schwefelsäure wurden die freien Säuren mit Petroläther ausgeschüttelt, die organische Phase mit Wasser alkalifrei gewaschen und eingedampft.

Der Rückstand wurde mit 3 ml Wasser versetzt und mit gesättigter Natriumcarbonat-Lösung auf einen pH von 6.2 gebracht. Dann fügte man 150 mg p-Phenylphenacylbromid und 5 ml Äthanol hinzu und erhitze 2 Stunden am Rückfluß. Nach dem Abkühlen vertrieb man den Alkohol bei Normaltemperatur und extrahierte die zurückbleibende Lösung 5mal mit je 20 ml Benzol. Die Benzolextrakte wurden über Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Der feste Rückstand wurde in 5 ml Petroläther/Äther-Gemisch (9:1) gelöst und zur Säulenchromatographie verwendet.

Bei der Herstellung der p-Phenylphenacylate der Testsäuren wurde in ähnlicher Weise verfahren. 0.005 Mol der Säure in 5 ml Wasser brachten wir mit 0.005 Mol p-Phenylphenacylbromid in 10 ml Äthanol bei pH 6.2 zur Reaktion. Die Reaktionsmischung wurde 24 Stunden zur Kristallisation beiseite gestellt und der ausgefallene Niederschlag mehrmals aus wässrigem Äthanol umkristallisiert.

b) Reinigung der Säurephenylphenacylate

Das in 5 ml Petroläther/Äther-Gemisch gelöste rohe Säurephenacylat-Gemisch wurde auf eine Kieselgel-Säule von 10 cm Höhe und 2 cm Durchmesser aufgebracht und die blau fluoreszierende Zone mit Petroläther/Äther herauseluiert.

c) Isolierung und Identifizierung von Pelargon- und Oenanthsäure

Das Eluat der Phenylphenacylate brachten wir zur Trockene. Der Rückstand wurde in 5 ml Benzin/Benzol-Gemisch (1:1) aufgelöst und an 20 g Kieselgel (0.05-0.2 mm) (Säule 50 x 2 cm) mit dem Elutionsmittel Benzin (Sp. 80 - 90°C)/Benzol 1:1 aufgetrennt. Die blau fluoreszierende Zone unterteilten wir in 15 Fraktionen zu 25 ml. Die einzelnen Fraktionen prüften wir dünnschichtchromatographisch auf ihre Zusammensetzung. Die Fraktionen 5 mit 6 und 11 waren einheitlich.

Der aus den Fraktionen 5 mit 8 erhaltene Rückstand wurde einmal aus verdünntem Äthanol umkristallisiert. Die weißen Kristalle zeigten einen Schmelzpunkt von 70 - 71°C. Der Mischschmelzpunkt mit authentischem Pelargonsäure-Phenacolat ergab keine Depression. Das IR-Spektrum (Abb.5, S.14) stimmte ebenfalls überein.

$C_{23}H_{28}O_3$ (352.5)	ber.:	C	78.37	H	8.01
	gef.:	C	78.87	H	7.96

Die aus der Fraktion 11 erhaltene Substanz besaß nach einmaligem Umkristallisieren aus verdünntem Äthanol einen Schmelzpunkt von 64°C. Der Mischschmelzpunkt mit authentischem Oenanthsäurephenacolat ergab keine Depression. Das IR-Spektrum (Abb.4, S. 14) stimmte ebenfalls mit diesem in allen Einzelheiten überein.

d) Isolierung und Identifizierung von Caprylsäure

Die Fraktionen 9 mit 10, die an der unter c) beschriebenen Kieselgel-Säule erhalten wurden, wurden vereinigt, in 2 ml Benzin/Benzol-Gemisch 1:1 gelöst und an 20 g Kieselgel (0.05 - 0.2 mm) (Säule 50 x 2 cm) mit dem Elutionsmittel Benzin (Sp. 80 - 90°C)/Benzol (1:1) aufgetrennt. Die blau fluoreszierende Zone unterteilten wir in 15 Fraktionen zu 25 ml. Der aus ^{den}Fraktionen 8 mit 9 erhaltene Rückstand lieferte nach einmaligem Umkristallisieren aus verdünntem Äthanol weiße Nadeln vom Schmelzpunkt 65°C. Der Mischschmelzpunkt mit authentischem Caprylsäure-Phenylphenacolat ergab keine Depression. Das IR-Spektrum (Abb. 6, S.14) stimmte ebenfalls überein.

$C_{22}H_{26}O_3$ (338.5)	ber.:	C	78.07	H	7.74
	gef.:	C	77.55	H	7.96

e) Plattenchromatographische Überprüfung

Adsorbens: Kieselgel GF₂₅₄, imprägniert mit 30%
Undecan (standardisiert, Haltermann) in
Petroläther (v/v)

Fließmittel: Dimethylformamid/Methanol/Wasser 4:1:1

Laufhöhe: 12 cm

Laufzeit: 180 Min.

Standardsubstanz: Buttergelb

Nachweis: UV-Licht (254 mμ)

	Mittl. R_F -Werte	Mittl. R_B -Werte
Capronsäure-Phenylphenacylat	0.68	1.11
Oenanthsäure-Phenylphenacylat	0.61	1.00
Caprylsäure-Phenylphenacylat	0.57	0.93
Pelargonsäure-Phenylphenacylat	0.54	0.86
Caprinsäure-Phenylphenacylat	0.48	0.79

VII. Untersuchung der Terpenkohlenwasserstoff-Fraktion

1. Abtrennung der Terpenkohlenwasserstoffe

18 g säurefreies Lindenblütenöl, gelöst in 20 ml Petroläther wurde an 200 g Kieselgel 0.2 - 0.5 mm (Säule 56 x 5.5 cm) mit 1500 ml Petroläther (Sp. 30 - 50°C) bei 0°C eluiert. Das Petroläther-Eluat wurde schonend bei einer Temperatur von 10°C im Vakuum eingedampft.

Ausbeute: 2 g.

Anschließend wurde die Terpenoid-Fraktion mit 1500 ml Äther ausgewaschen. Um ein Rissigwerden der Säulenfüllung zu vermeiden, erfolgte der Übergang von Petroläther zu Äther stufenweise, indem zu je 50 ml Elutionsmittel 10% mehr Äther zugesetzt wurde. Das Äther-Eluat wurde bei Zimmertemperatur im Vakuum vom Äther befreit.

Ausbeute: 16 g.

2. Reinigung der Terpenkohlenwasserstoffe über Harnstoff- Addukte

2 g Terpenkohlenwasserstoff-Gemisch wurden in 8 ml Benzol p.a. warm gelöst und die etwa 60°C warme Lösung unter ständigem Umschütteln zu einer gleichwarmen übersättigten methanolischen Harnstofflösung (10 g Harnstoff in 18 ml Methanol p.a.) gegeben. Man rührte noch eine weitere Stunde lang bis zum Erkalten der Lösung und stellte dieselbe bei 0°C 5 Stunden lang beiseite. Anschließend wurden die Addukte abgesaugt und mehrmals mit kleinen Mengen harnstoff-gesättigten Methanols gewaschen. Die zum Waschen benutzte Harnstofflösung soll dabei die gleiche oder eine leicht höhere, nicht aber eine tiefere Temperatur als die Addukte besitzen. Die Waschflüssigkeiten wurden mit dem Hauptfiltrat vereinigt.

Die Addukte wurden durch Eintragen in heißes Wasser zerlegt und die abgeschiedenen Stoffe in 50 ml Petroläther aufgenommen. Die Petrolätherphase wurde nach dem Trocknen mit Natriumsulfat bei Zimmertemperatur im Vakuum eingedampft.

Ausbeute: 0.3 g.

Das von den Addukten abgetrennte Filtrat wurde mit 100 ml Wasser verdünnt. Die homogene Flüssigkeit trennte sich dabei in eine wässrig-methanolische Schicht, die man mit Kochsalz sättigte und eine darüberstehende Benzolschicht, die nach der Phasentrennung abgetrennt wurde. Man schüttelte noch 2mal mit je 50 ml Benzol aus, wusch die vereinigten Benzolauszüge unter Vermeidung starken Schüttelns mit gesättigter Kochsalzlösung, trocknete mit Natriumsulfat und entfernte das Benzol im Vakuum bei Zimmertemperatur.

Ausbeute: 1.2 g.

1.2 g Terpenkohlenwasserstoff-Gemisch, gelöst in 5 ml Petroläther wurden an 20 g Kieselgel 0.05 - 0.2 mm (Säule 30 x 1.8 cm) mit Petroläther (Sp. 30 - 50°C) als Elu-

tionsmittel bei einer Temperatur von 0°C aufgetrennt. Das Eluat wurde in 20 Fraktionen zu 25 ml unterteilt. Die einzelnen Fraktionen wurden dünnschicht- und gaschromatographisch untersucht.

4. Chromatographische Untersuchungen

a) Dünnschichtchromatographie

Adsorbens: Kieselgel G

Fließmittel: Hexan

Laufhöhe: 15 cm

Laufzeit: 75 Min.

Standardsubstanz: Azulen

Nachweis: Vanillin-Schwefelsäure, Osmiumtetroxid-Dampf und UV-Licht (350 mμ).

	Mittl. R_F -Werte	Mittl. R_G -Werte
α -Pinen	0.96	2.89
β -Pinen	0.96	2.89
Camphen	0.96	2.89
Myrcen	0.91	2.73
Limonen	0.91	2.73
α -Phellandren	0.91	2.73
γ -Terpinen	0.89	2.65
p-Cymol	0.84	2.52

Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz: 1 g Vanillin wurden in 99 ml conc. Schwefelsäure p.a. gelöst. Mit dieser Lösung wurden die Platten kräftig besprüht und danach 15 Min. bei 120°C erwärmt. Die Terpenkohlenwasserstoffe ergaben teilweise starke Farbunterschiede: α -Pinen violett, β -Pinen violett, Camphen braun, Myrcen violett, Limonen grau-grün, α -Phellandren braun, γ -Terpinen grau-grün, p-Cymol lila.

Osmiumtetroxid-Dampf: Die Kieselgel-Platten wurden in einer Kammer 1 Stunde lang mit Osmiumtetroxid bedampft.

Alle Substanzen mit olefinischen Doppelbindungen erschienen durch Reduktion des Tetroxids zum Dioxid bzw. zu elementarem Osmium als braunschwarze Flecke.

b) Chromatographie

Säule: 3 m x 4 mm, Apiezon L auf Chromosorb WS (45-60 mesh)
20%

Temperatur: 125°C

Strömungsgeschwindigkeit: 71 ml/Min.H₂

Papiervorschub: 0.5 cm/Min.

Einspritzmenge: 2.5 µl

Empfindlichkeit: 250 mA/2.5 mV

Säule: 3 m x 4 mm, Reoplex 400 auf Chromosorb WS (45-60 mesh)
20%

Temperatur: 85°C

Strömungsgeschwindigkeit: 52 ml/Min.H₂

Papiervorschub: 0.5 cm/Min.

Einspritzmenge: 5 µl

Empfindlichkeit: 200 mA/2.5 mV

Säule: 2.4 m x 4 mm, LAC 1E 296 auf Chromosorb WS (45-60 mesh) 20%

Temperatur: 85°C

Strömungsgeschwindigkeit: 30 ml/Min.H₂

Papiervorschub: 0.5 cm/Min.

Einspritzmenge: 3 µl

Empfindlichkeit: 200 mA/2.5 mV

Säule: 3 m x 4 mm, β , β -Oxydipropionitril auf Chromosorb WS
(45-60 mesh) 15%

Temperatur: 70°C

Strömungsgeschwindigkeit: 50 ml/Min.H₂

Papiervorschub: 0.5 cm/Min.

Einspritzmenge: 5 µl

Empfindlichkeit: 200 mA/2.5 mV

T a b e l l e 11

Relative Retentionsvolumina, bezogen auf Limonen ($\times 10^3$) der
Terpenkohlenwasserstoffe des Lindenblütenöls

Apiezon L		Reoplex 400		LAC 1R 296		β, β -Oxydipropionitril	
Peak	V _{rel}	Peak	V _{rel}	Peak	V _{rel}	Peak	V _{rel}
1	331	1	257	1	284	1	306
2	373	2	302	2	322	2	463
3	423	3	358	3	374	3	666
4	465	4	430	4	449	4	713
5	507	5	480	5	494	5	866
6	592	6	705	6	707	6	1000
7	640	7	770	7	781	7	1100
8	696	8	894	8	896	8	1200
9	831	9	1000	9	1000	9	1325
10	930	10	-	10	1075	10	1606
11	979	11	1307	11	1287	11	1800
12	1155	12	1676	12	1598	12	2000
13	1366	13	1787	13	1758	13	2319
14	1514	14	1950	14	1931	14	2706
15	2014						

5. Herkunft und Herstellung der Vergleichssubstanzen

T a b e l l e 12

Herkunft der Terpenkohlenwasserstoffe

Terpenkohlenwasserstoff	Herkunft
Myrcen	L.Light u. Co,London(England)
cis u. trans Ocimen	Dehydratisierung von Linalool ⁸²⁾
α -Terpinen	Dehydratisierung von α -Terpineol ⁸³⁾⁸⁴⁾
α -Phellandren	Eastman Kodak Company, New York (USA)
γ -Terpinen	Dragoco, Holzminden/Weser
β -Phellandren	ätherisches Öl des Wasserfenchels (Oenanthe aquatica L.)
Limonen	Dragoco, Holzminden/Weser
Terpinolen	Dehydratisierung von α -Terpineol ⁸⁴⁾
p-Cymol	Riedel-de Haen AG, Seelze-Hannover
α -Pinen	Farbwerke Hoechst AG, Werk Gersthofen
β -Pinen	L.Light u. Co,London(England)
Sabinen	ätherisches Öl des Sadebaums (Juniperus sabina L.)
Camphen	Farbwerke Hoechst AG, Werk Gersthofen

Herstellung der Terpenkohlenwasserstoffe:

c i s - und trans - O c i m e n : 100 g Linalool (Sp.₁₃⁸⁵°C), gereinigt über eine 20 cm lange Vigreux-Kolonne versetzte man mit 5 g Kaliumhydrogensulfat und destillierte die flüchtigen Anteile ab. Das Kohlenwasserstoff-Wasser-Gemisch wurde 2mal mit je 50 ml Petroläther ausgeschüttelt und die Petrolätherphase mit Natriumsulfat getrocknet. Anschließend wurde die Petrolätherlösung auf etwa 10 ml eingengt und an 150 g Kieselgel (0.2 - 0.5 mm) und Petroläther als Elutions-

mittel vom nicht umgesetzten Linalool befreit. Aus dem Kohlenwasserstoff-Gemisch wurden die beiden Ocimene mittels präparativer Gaschromatographie an einer β, β -Oxydipropionitril-Säule abgetrennt. Die beiden Ocimene wurden in 90%iger Reinheit erhalten.

Säule: 3 m x 1.8 cm, β, β -Oxydipropionitril auf Kieselgur
(0.1 - 0.2 mm) 15%

Säulentemperatur: 70°C

Einspritztemperatur: 120°C

Strömungsgeschwindigkeit: 300 ml/Min. N₂

Papiervorschub: 0.5 cm/Min.

Einspritzmenge: 0.5 ml

Empfindlichkeit: 130 mA/5 mV.

α - T e r p i n e n : 20 g α -Terpineol wurden am Rückfluß mit einer Mischung von 80 g Oxalsäurehydrat und 100 ml Wasser 12 Stunden lang erhitzt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung mit Wasserdampf destilliert und das erhaltene Destillat an 150 g Kieselgel (0.2 - 0.5 mm) mit Petroläther als Elutionsmittel vom nicht umgesetzten α -Terpineol befreit. Aus der auf diese Weise erhaltenen TKW-Fraktion wurde das α -Terpinen an einer präparativen Apiezon L-Säule stark angereichert und schließlich an einer präparativen Polyäthylenglykol 4000-Säule in 94%iger Reinheit erhalten.

Säule: 4.8 m x 1.8 cm, Apiezon L auf Kieselgur (0.1 - 0.2 mm)

Säulentemperatur: 170°C

Einspritztemperatur: 220°C

Strömungsgeschwindigkeit: 410 ml/Min. N₂

Papiervorschub: 0.5 cm/Min.

Einspritzmenge: 0.5 ml

Empfindlichkeit: 130 mA/5 mV

Säule: 4.8 m x 1.8 cm, Polyäthylenglykol 4000 auf Kieselgur
(0.1 - 0.2 mm) 20%

Säulentemperatur: 130°C

Einspritztemperatur: 180°C

Strömungsgeschwindigkeit: 360 ml/Min. N₂

Papiervorschub: 0.5 cm/Min.

Einspritzmenge: 0.5 ml

Empfindlichkeit: 130 mA/5 mV

β - P h e l l a n d r e n u n d S a b i n e n : Zur Isolierung von β-Phellandren und Sabinen wurden je 500 g Droge mit Wasserdampf destilliert. Vom erhaltenen Öl wurde jeweils die Terpenkohlenwasserstoff-Fraktion mittels Säulenchromatographie an 200 g Kieselgel (0.2 - 0.5 mm) mit Petroläther als Elutionsmittel abgetrennt. Aus der auf diese Weise erhaltenen Fraktionen beider Öle wurden β-Phellandren und Sabinen durch präparative Gaschromatographie an einer β,β-Oxydipropionitril-Säule abgetrennt. (Versuchsbedingungen siehe unter Ocimen). Beide Substanzen wurden in 96%iger Reinheit erhalten.

T e r p i n o l e n : 80 g Oxalsäurehydrat und 100 ml Wasser wurden in einem Dreihalskolben, der mit einem absteigenden Kühler, einem Tropftrichter und einem Dampfeinleitungsrohr versehen war, zum Sieden erhitzt. Anschließend wurde Wasserdampf durch die kochende Lösung geleitet und 20 g α-Terpineol tropfenweise zugegeben. Nach erfolgter Zugabe wurde die Mischung noch eine Stunde lang mit Wasserdampf destilliert. Das erhaltene Produkt wurde in der gleichen Weise wie bei der Herstellung von α-Terpinen beschrieben wurde, aufgearbeitet und getrennt. Wir erhielten 94%iges Terpinolen.

6. Isolierung von p-Cymol

Aus der Terpenkohlenwasserstoff-Fraktion 4 mit 6 (siehe Kapitel VII. 3.) wurde durch präparative Gaschromatographie an einer Polyäthylenglykol 4000-Säule (Versuchsbedingungen, siehe unter α -Terpinen) eine Substanz isoliert, die auf Grund von UV- und IR-Spektren als p-Cymol identifiziert werden konnte.

UV-Spektrum in Isooctan (Uvasol):

$\lambda_{\max}$ I	=	259 m μ	(log ϵ 2.48)
$\lambda_{\max}$ II	=	265 m μ	(log ϵ 2.61)
$\lambda_{\max}$ III	=	267 m μ	(log ϵ 2.59)
$\lambda_{\max}$ IV	=	273 m μ	(log ϵ 2.71)

IR-Spektrum:

3040 cm ⁻¹	CH-Valenzschwingung (aromatisch) (ν CH)
2960 u. 2870 cm ⁻¹	CH-Valenzschwingungen (aliphatisch) (ν CH)
1890 u. 1786 cm ⁻¹	Oberschwingungen der CH-Deformationsschwingungen (bending out of plane) (γ CH) (charakteristisch für die aromatische Substitution)
1640 cm ⁻¹	C=C-Valenzschwingung (ω C=C)
1515 cm ⁻¹	C=C-Valenzschwingung (ν C=C)
1450 cm ⁻¹	CH-Deformationsschwingung (asym.) (δ CH) (CH ₃ -Gruppe)
1360 u. 1380 cm ⁻¹	Resonanzaufspaltung der CH-Deformationsschwingung der beiden CH ₃ -Gruppen (bending in plane) (δ CH)
813 cm ⁻¹	CH-Kippschwingung (wagging out of plane) (γ CH) (charakteristisch für die Zahl und Stellung der Substituenten im aromatischen System.)

7. Isolierung des Terpenkohlenwasserstoffes Peak 7

Die Isolierung dieses Kohlenwasserstoffes aus der TKW-Fraktion 7 (siehe Kapitel VII. 3.) erfolgte durch präparative Gaschromatographie an einer Polyäthylenglykol 4000-Säule analog der auf S. 88 angegebenen Weise.

Die UV- und IR-spektroskopischen Daten sind folgende:

UV-Spektrum in Isooctan (Uvasol):

$\lambda_{\max I}$	=	260 m μ	(log ϵ 2.25)
$\lambda_{\max II}$	=	265 m μ	(log ϵ 2.52)
$\lambda_{\max III}$	=	269 m μ	(log ϵ 2.12)
$\lambda_{\max IV}$	=	273 m μ	(log ϵ 1.95)

IR-Spektrum:

3030 cm ⁻¹	CH-Valenzschwingung (aromatisch) (ν CH)
2930 u. 2880 cm ⁻¹	CH-Valenzschwingung (aliphatisch) (ν CH)
1600 cm ⁻¹	C=C-Valenzschwingung (ω C=C)
1495 cm ⁻¹	C=C-Valenzschwingung (ν C=C)
1370 u. 1450 cm ⁻¹	CH-Deformationsschwingungen (δ CH) (CH ₃ -Gruppe)
685 u. 765 cm ⁻¹	CH-Kippschwingungen (wagging out of plane)(γ CH) (charakteristisch für die Zahl und Stellung der Substituenten in aromatischen System.)

VIII. Untersuchung der Fraktion der Carbonylverbindungen

1. Abtrennung der Carbonylverbindungen

16 g säure- und terpenkohlenwasserstoff-freies Öl und 8.1 g Girard D-Reagenz wurden in 81 ml abs.Methanol gelöst und 24 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Anschließend erhitze man das Reaktionsgemisch unter mäßigem Stickstoffstrom 2 Stunden auf dem Wasserbad. Nach dem Erkalten gossen wir in 800 ml Eiswasser und schüttelten 5mal mit je 200 ml Dichlormethan aus. Anschließend wuschen wir die Dichlormethanphase 2mal mit je 100 ml Wasser, fügten das Waschwasser zur wässrigen Phase hinzu und schüttelten diese erneut mit 100 ml Dichlormethan aus. Diese Dichlormethanwaschphase wurde verworfen. Die vereinigten Dichlormethan-Ausschüttelungen, die die übrigen Ölbestandteile enthielten, dampfte man nach dem Trocknen mit Natriumsulfat im Vakuum bei Zimmertemperatur ein.

Ausbeute: 13,5 g (Fraktion IV, Schema 1, S. 4).

Die Wasserphase spülte man zusammen mit 200 ml Dichlormethan in einen Scheidetrichter, versetzte mit 200 ml 35%igem Formalin und ließ die mit Stickstoff überschichtete Reaktionslösung 4 Tage im Dunkeln bei Zimmertemperatur unter öfterem Umschütteln und mehrmaligem Erneuern des Dichlormethans stehen.

Ausbeute: 0.8 g (Carbonylverbindungen).

2. Trennung der Carbonylverbindungen in eine Aldehyd- und eine Ketonfraktion

Zu einer Lösung von 0.5 g Oxoverbindungen in 15 ml 95%igem Athanol wurde eine Lösung von 2.5 g Silbernitrat in 12 ml Wasser gegeben. Anschließend ließ man innerhalb von 30 Min. unter Rühren eine Lösung von 1.2 g Natriumhydrid in 50 ml Wasser zutropfen und ließ weitere 12 Stunden unter fortgesetztem Rühren reagieren. Nach beendigter

Reaktion wurde vom abgeschiedenen Silberoxid abzentrifugiert und die überstehende Flüssigkeit abgetrennt. Das Silberoxid wurde anschließend 3mal mit je 10 ml Äthanol und 3mal mit 10 ml Wasser digeriert und diese Flüssigkeiten mit der ersten Lösung vereinigt. Man verdünnte die vereinigten Lösungen mit 150 ml Wasser und schüttelte die nicht oxydierten Ketonbestandteile 3mal mit je 100 ml Petroläther aus. Die Petrolätherphase wurde mit 10%iger Weinsäurelösung und Wasser alkalifrei gewaschen und nach dem Trocknen mit Natriumsulfat im Vakuum bei Zimmertemperatur eingeeengt.

Ausbeute: 0.45 g Ketonbestandteile.

Die wässrige Phase säuerten wir mit 10%iger Schwefelsäure bis zur kongosauren Reaktion an und schüttelten sie 3mal mit je 100 ml Petroläther aus. Die mit Wasser gewaschene Petrolätherphase wurde nach dem Trocknen mit Natriumsulfat auf etwa 10 ml eingeeengt und bei Zimmertemperatur mit ätherischer Diazomethanlösung bis zur bleibenden Gelbfärbung des Reaktionsproduktes versetzt. Nach 30minütigem Stehenlassen der Reaktionslösung bei Zimmertemperatur vertrieb man das Diazomethan-Äther-Gemisch im Vakuum bei Raumtemperatur.

Ausbeute: 0.2 g Säuremethylester.

3. Isolierung von Cuminaldehyd

a) Reduktion der Säuremethylester

Zu einer Lösung von 50 mg Lithiumaluminiumhydrid in 10 ml wasserfreiem Äther wurde langsam unter Kühlung eine Lösung von 100 mg Säuremethylester (Kapitel VIII. 2.) in 5 ml abs. Äther zugetropft. Man ließ das Reaktionsgemisch 30 Min. bei Zimmertemperatur stehen und kochte anschließend kurz auf. Nach dem Erkalten zersetzten wir den Lithiumaluminium-Alkohol-Komplex vorsichtig und unter Kühlung mit feuchtem Äther und anschließend mit Wasser. Nach dem Auflösen des abgeschiedenen Hydroxids mit

halb-konzentrierter Salzsäure wurde die Ätherphase abgetrennt und die wässrige Phase noch 2mal mit je 25 ml Äther ausgeschüttelt. Die vereinigten Äther-Ausschüttelungen wusch man mit 5%iger Natriumhydrogenkarbonatlösung und Wasser säurefrei, trocknete mit Natriumsulfat und engte im Vakuum bei Zimmertemperatur ein.

Ausbeute: 50 mg **Alkohole**.

b) Oxydation der Alkohole

Zu einer Lösung von 50 mg Alkohol-Gemisch in 1.5 ml Eisessig p.a. wurde unter Kühlung tropfenweise eine Lösung von 100 mg Chromsäureanhydrid in 10 ml Eisessig p.a. zugefügt und anschließend 30 Min. auf dem Wasserbad erhitzt. Daß mit 50 ml Wasser verdünnte Reaktionsgemisch schüttelte man 3mal mit je 50 ml Petroläther aus und engte die mit 5%iger Natriumhydrogenkarbonatlösung und Wasser gewaschene und über Natriumsulfat getrocknete Petrolätherphase im Vakuum bei Zimmertemperatur ein.

c) Herstellung des 2,4-Dinitrophenylhydrazons

Das durch Oxydation erhaltene Aldehyd-Gemisch wurde in 1 ml Äthanol 95%ig aufgenommen und mit einer phosphorsauren 2,4-Dinitrophenylhydrazinlösung nach JOHNSON⁸⁵⁾ versetzt. Nach eintägigem Stehenlassen sammelte man den ausgefallenen Niederschlag, wusch ihn mit wenig Wasser phosphorsäurefrei und trocknete ihn im Vakuum bei Zimmertemperatur. Anschließend chromatographierten wir den in 2 ml Benzol gelösten Hydrazon-Niederschlag an 50 g Aluminiumoxid neutral (6% Wasser) (Säule 40 x 1.8 cm) mit dem Elutionsmittel Benzin/Äther 95:5. Von den 18 aufgefangenen Fraktionen wurden die Fraktionen 9 bis 17 vereinigt und zur Trockene eingedampft. Der Abdampfrückstand kristallisierte aus Benzol in roten Nadeln vom Schmelzpunkt 242°C.

Ausbeute: 6 mg.

UV-Spektrum in Isooctan (Uvasol):

$$\lambda_{\max} = 367 \text{ m}\mu \quad (\log \epsilon \ 4.48)$$

Zur Herstellung der Hydrazone-UV-Spektren wurde eine Stammlösung hergestellt, die etwa 2×10^{-4} g Hydrazone/ml Isooctan enthielt. Von dieser Stammlösung verdünnten wir einen aliquoten Teil, so daß die Endkonzentration der zu messenden Lösung etwa 10 γ Hydrazone/ml betrug.

UV-Spektrum in alkalischer Lösung:

$$\lambda_{\max \text{ I}} = 464 \text{ m}\mu \quad (\log \epsilon \ 4.52)$$

$$\lambda_{\max \text{ II}} = 564 \text{ m}\mu \quad (\log \epsilon \ 2.20)$$

Zur Herstellung der alkalischen Hydrazone-UV-Spektren verdünnten wir einen aliquoten Teil einer Stammlösung, die etwa 2×10^{-4} g Hydrazone/ml Chloroform (Uvasol) enthielt, mit soviel 0.25 N äthanolischer Natriumhydroxidlösung, daß ebenfalls eine Endkonzentration von 10 γ Hydrazone/ml entstand. Nach 10 Sekunden langem Schütteln der Lösung wurde das Spektrum sofort gemessen. Als Vergleichslösung diente eine Mischung gleicher Teile Chloroform und äthanolisches Natriumhydroxid. Die alkoholische Natriumhydroxid-Lösung wurde bereitet, indem man 10 g Natriumhydroxid p.a. in 100 ml dest. Wasser löste und mit 95%igem Äthanol (Uvasol) zu einem Liter auffüllte. Die Lösung wurde über Nacht stehen gelassen und anschließend vom ausgefallenen Karbonat abfiltriert.

$\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_4$	(328.3)	ber.:	C	58.53	H	4.91	N	17.07
		gef.:	C	58.53	H	4.85	N	16.91

4. Chromatographische Untersuchungen

a) Gaschromatographie

Carbonylverbindungen:

Säule: 2.4 m x 4 mm, LAC 1R 296 auf Kieselgur (0.1-0.2 mm) 20%

Temperatur: 125°C

Strömungsgeschwindigkeit: 41 ml/Min.H₂

Papiervorschub: 0.5 cm/Min.

Einspritzmenge: 5 µl

Empfindlichkeit: 200 mA/2.5 mV

Carbonsäuremethylester:

Säule: 2.4 m x 4 mm, LAC 1R 296 auf Kieselgur (0.1-0.2 mm) 20%

Temperatur: 125°C

Strömungsgeschwindigkeit: 41 ml/Min.H₂

Papiervorschub: 0.5 cm/Min.

Einspritzmenge: 5 µl

Empfindlichkeit: 200 mA/2.5 mV

Säule: 2.4 m x 4 mm, Diäthylenglykolsuccinatpolyester auf Kieselgur (0.1-0.2 mm) 20%

Temperatur: 125°C

Strömungsgeschwindigkeit: 71 ml/Min.H₂

Papiervorschub: 1 cm/Min. und 0.5 cm/Min.

Einspritzmenge: 2.5 µl

Empfindlichkeit: 250 mA/2.5 mV

Säule: 2 m x 4 mm, Apiezon L auf Chromosorb WS (45-60 mesh) 16%

Säulentemperatur: 165°C

Einlaßtemperatur: 189°C

Detektortemperatur: 190°C

Strömungsgeschwindigkeit: 60 ml/Min.Argon

Papiervorschub: 0.5 cm/Min.

Einspritzmenge: 1 µl einer 10%igen Chloroformlösung

Detektorempfindlichkeit: 500 V

Schreiberempfindlichkeit: 1 x 10⁻⁷A

Säule: 2 m x 4 mm, EGSS-X auf Gaschrom P (100-120 mesh) 15%
Säulentemperatur: 165°C
Einlaßtemperatur: 189°C
Detektortemperatur: 190°C
Strömungsgeschwindigkeit: 60 ml/Min. Argon
Papiervorschub: 0.5 cm/Min.
Einspritzmenge: 1 µl einer 10%igen Chloroformlösung
Detektorempfindlichkeit: 500 V
Schreiberempfindlichkeit: 1×10^{-7} A

b) Papierchromatographie der Carbonsäurehydroxamate

Die Herstellung der Säurehydroxamate, ihre chromatographische Trennung und Sichtbarmachung wurde auf S. 77 eingehend beschrieben.

c) Dünnschichtchromatographie des 2,4-Dinitrophenylhydrazons

α) Adsorptionschromatographie

Adsorbens: Kieselgel G
Fließmittel: Hexan/Äther 9:1
Laufhöhe: 15 cm
Laufzeit: 75 Min.
Standardsubstanz: Buttergelb
Nachweis: Tageslicht oder UV-Licht (350 mµ)

	Mittl. R_F -Werte	Mittl. R_B -Werte
Cuminaldehyd-DNPH	0.34	0.51
Buttergelb	0.46	1.00

β) Verteilungschromatographie

Adsorbens: Kieselgel G, imprägniert mit 10% Paraffin fl.
in Petroläther (v/v)
Fließmittel: Dimethylformamid/Methanol/Wasser 4:1:1
Laufhöhe: 12 cm
Laufzeit: 180 Min.
Standardsubstanz: Buttergelb
Nachweis: Tageslicht oder UV-Licht (350 mµ)

	Mittl. R_f -Werte	Mittl. R_B -Werte
Cuminaldehyd-DNPH	0.70	1.00
Buttergelb	0.70	1.00

5. Herstellung der 2,4-Dinitrophenylhydrazone von Ketonen

Zu einer Lösung von 450 mg Ketonfraktion in 2 ml 95%igem Äthanol fügte man Johnson-Reagenz und ließ die Reaktionslösung 24 Stunden bei Zimmertemperatur stehen. Da die entstandenen 2,4-DNPH ölig anfielen, wurde die Reaktionslösung mit 0.1 ml Wasser versetzt und 3mal mit je 20 ml Hexan p.a. ausgeschüttelt. Anschließend schüttelten wir die vereinigten Hexan-Ausschüttelungen 2mal mit 2 N Salzsäure durch, trockneten die Hexanphase mit Natriumsulfat und vertrieben das Lösungsmittel im Vakuum bei Zimmertemperatur.
Ausbeute: 0.7 g

6. Trennung der Keton-2,4-Dinitrophenylhydrazone

700 mg des in 3 ml Benzin gelösten Hydrazon-Gemisches chromatographierten wir an 50 g Aluminiumoxid neutral (6% Wasser) (Säule 40 x 1.8 cm) mit dem Elutionsmittel Benzin/Äther 95:5. Die Hydrazon-Zone unterteilten wir in 20 Fraktionen zu 25 ml. Man vereinigte die Fraktionen 1 bis 5, 6 bis 7, 8 bis 14 und 15 bis 20.

Die Fraktion 1 mit 5 wurde im Vakuum bei Zimmertemperatur zur Trockene gebracht, in 2 ml Benzin/Äther-Gemisch gelöst und an einer 40 cm langen und 1.8 cm dicken Säule, die 50 g Aluminiumoxid neutral (3% Wasser) enthielt, chromatographiert. Als Elutionsmittel verwendeten wir Benzin/Äther 95:5. Die gefärbte Hydrazon-Zone unterteilten wir in 40 Fraktionen zu 10 ml. Die Fraktionen 1 mit 2 verwarf man. Vereinigt wurden die Fraktionen 3 mit 4, 5 mit 6, 7 mit 9, 10 mit 13, 14 mit 15, 16 mit 20, 21 mit 24, 25 mit 26, 27 mit 29, 30 mit 31, 32 mit 33, 34 mit 35 und 36 mit 40.

7. Isolierung eines Keton-2,4-Dinitrophenylhydrazons

Die Fraktion 3 mit 4, gelöst in 1 ml Benzol, wurde abermals an einer Säule von 40 cm Füllhöhe und 1.8 cm Durchmesser, die 20 g neutrales Aluminiumoxid (3% Wasser) enthielt, chromatographiert. Als Elutionsmittel diente Benzin/Benzol 1:1. Von den 20 aufgefangenen Fraktionen (10 ml) vereinigten wir die Fraktionen 8 bis 14 und kristallisierten den Abdampfdruckstand 1mal aus 95%igem Äthanol um. Die orangefarbenen Nadeln wiesen einen Schmelzpunkt von 135°C auf.

UV-Spektrum in Isooctan (Uvasol):

$$\lambda_{\max} = 344 \text{ m}\mu \quad (\log \epsilon \ 4.35)$$

UV-Spektrum in alkalischer Lösung:

$$\lambda_{\max \text{ I}} = 432 \text{ m}\mu \quad (\log \epsilon \ 4.37)$$

$$\lambda_{\max \text{ II}} = 530 \text{ m}\mu \quad (\log \epsilon \ 4.14)$$

8. Chromatographische Untersuchungen

a) Gaschromatographie

Säule: 2.4 m x 4 mm, LAC 1 R 296 auf Kieselgur (0.1-0.2 mm) 20%

Temperatur: 125°C

Strömungsgeschwindigkeit: 65 ml/Min. H₂

Papiervorschub: 1 cm/Min. und 0.5 cm/Min.

Einspritzmenge: 1.5 μ l

Empfindlichkeit: 250 mA/2.5 mV

Säule: 2.4 m x 4 mm, Diäthylenglykolsuccinatpolyester auf Kieselgur (0.1-0.2 mm) 20%

Temperatur: 125°C

Strömungsgeschwindigkeit: 71 ml/Min. H₂

Papiervorschub: 5 μ l

Empfindlichkeit: 200 mA/2.5 mV

b) Dünnschichtchromatographie

α) Adsorptionschromatographie

Adsorbens: Kieselgel G

Fließmittel: Hexan/Äther 9:1

Laufhöhe: 15 cm

Laufzeit: 75 Min.

Standardsubstanz: Buttergelb

Nachweis: Tageslicht oder UV-Licht (350 mμ)

	Mittl. R_f -Werte	Mittl. R_B -Werte
Keton-DNPH	0.70	1.50
2-Octanon-DNPH	0.30	1.00
3-Octanon-DNPH	0.37	1.22
2-Nonanon-DNPH	0.30	1.00
3-Nonanon-DNPH	0.38	1.27
2-Decanon-DNPH	0.31	1.07
2-Tridecanon-DNPH	0.34	1.13

β) Verteilungschromatographie

Adsorbens: Kieselgel G, imprägniert mit 10% Paraffin
fl. in Petroläther (v/v)

Fließmittel: Dimethylformamid/Methanol/Wasser 4:1:1

Laufhöhe: 12 cm

Laufzeit: 180 Min.

Standardsubstanz: Buttergelb

Nachweis: Tageslicht oder UV-Licht (350 mμ)

	Mittl. R_f -Werte	Mittl. R_B -Werte
Keton-DNPH	0.59	0.82
2-Octanon-DNPH	0.58	0.72
3-Octanon-DNPH	0.57	0.71
2-Nonanon-DNPH	0.53	0.66
3-Nonanon-DNPH	0.52	0.65
2-Decanon-DNPH	0.47	0.58
2-Tridecanon-DNPH	0.22	0.27

IX. Untersuchung der primären Alkohole

1. Abtrennung der primären Alkohole

10 g ätherisches Öl und 10 g phthalsäurefreies Phthalsäureanhydrid wurden in 100 ml abs. Pyridin gelöst und 24 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Nach beendigter Phthalisierung überführte man die Reaktionsmischung mit 200 ml peroxidfreiem Äther in einen Scheidetrichter und versetzte unter Kühlung mit 10%iger Schwefelsäure bis zur kongosauren Reaktion der wässrigen Phase. Die Ätherphase wurde abgetrennt, die wässrige Phase noch 2mal mit je 100 ml Äther ausgeschüttelt und die vereinigten mit Wasser säurefrei gewaschenen Ätherauszüge im Vakuum bei Zimmertemperatur eingedampft. Den Rückstand, bestehend aus nicht umgesetzten Öl und Phthalsäureestern behandelten wir mit 200 ml warmer 10%iger Sodalösung und befreiten anschließend durch 3maliges Ausschütteln mit je 100 ml Petroläther vom nicht umgesetzten Öl. Die mit Wasser gewaschene Petrolätherphase wurde nach dem Trocknen mit Natriumsulfat im Vakuum bei Zimmertemperatur eingedampft. Ausbeute: 8 g.

Die wässrige alkalische Lösung wurde mit 10%iger Schwefelsäure bis zur kongosauren Reaktion angesäuert, 3mal mit je 100 ml peroxidfreiem Äther ausgeschüttelt und die mit Wasser gewaschenen vereinigten Äther-Ausschüttelungen im Vakuum bei Zimmertemperatur eingedampft. Den in 5 ml Methanol gelösten Abdampfrückstand versetzten wir mit 30 ml methanolischer Kalilauge (10 g KOH, 60 ml MeOH, 6 ml Wasser). Nach 12stündiger Verseifung bei Zimmertemperatur verdünnte man mit 30 ml Wasser und schüttelte 3mal mit je 50 ml Petroläther aus. Die Petroläther-Ausschüttelung wurde nach dem Waschen mit wässriger 10%iger Weinsäurelösung und Wasser mit Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum bei Zimmertemperatur vom Lösungsmittel befreit. Ausbeute: 700 mg.

2. Gaschromatographische Untersuchung

- a) Säule: 2,4 m x 4 mm, LAC 1R 296 auf Kieselgur (0,1-0,2 mm)
20%

Säulentemperatur: 140°C

Strömungsgeschwindigkeit: 49 ml/Min.H₂

Papiervorschub: 0,5 cm/Min.

Einspritzmenge: 2,5 µl

Empfindlichkeit: 250 mA/2,5 mV

- b) Säule: 2,4 m x 4 mm, Diäthylenglykolsuccinatpolyester
auf Kieselgur (0,1-0,2 mm) 20%

Säulentemperatur: 140°C

Strömungsgeschwindigkeit: 60 ml/Min.H₂

Papiervorschub: 0,5 cm/Min.

Einspritzmenge: 2,5 µl

Empfindlichkeit: 250 mA/2,5 mV

T a b e l l e 13

Relative Retentionsvolumina, bezogen auf n-Octanol ($\times 10^3$) der
primären Alkohole des Lindenblütenöls

LAC 1R 296		Diäthylenglykolsuccinat	
Peak	V _{rel}	Peak	V _{rel}
1	273	1	293
2	295	2	379
3	330	3	414
4	375	4	483
5	409	5	621
6	477	6	724
7	523	7	897
8	614	8	1000
9	682	9	1207
10	750	10	1448
11	841	11	1631
12	1000	12	2034
13	1091	13	2310
14	1318	14	2759
15	1545	15	3241
16	1682	16	3345
17	1886	17	3828
18	2205	18	4207
19	2523	19	4621
20	2727	20	4956
21	2886		
22	3045		
23	3455		
24	3727		
25	3818		
26	4227		
27	4864		
28	6045		

T a b e l l e 14

Relative Retentionsvolumina, bezogen auf n-Octanol ($\times 10^3$) der zum Vergleich benutzten Testsubstanzen

Verbindung	stationäre Phase	
	LAC 1R 296	Diäthylenglykolsuccinatester
n-Hex-3-en-ol-(1)	500	431
n-Heptanol-(1)	738	724
n-Octanol-(3)	762	759
n-Octanol-(1)	1000	1000
n-Nonanol-(1)	1643	1630
n-Decanol-(1)	2500	2458
Citronellol	2619	2598

3, Säulenchromatographische Trennung der Alkohol-3,5-

Dinitrobenzoate

a) Herstellung der 3,5-Dinitrobenzoate

700 mg Alkohole, 700 mg 3,5-Dinitrobenzoylchlorid, 2 ml abs. Pyridin und 10 ml abs. Benzol wurden 30 Min. unter Feuchtigkeitsausschluß auf dem Wasserbad erhitzt. Nach beendeter Reaktion verdünnte man mit 30 ml peroxidfreiem Äther und wusch die Ätherphase mit 10%iger Schwefelsäure, 10%iger Sodalösung und Wasser. Nach dem Trocknen der Ätherphase mit Natriumsulfat wurde im Vakuum bei Zimmertemperatur eingedampft.

Ausbeute: 1.3 g

b) Säulenchromatographische Abtrennung der 3,5-Dinitrobenzoate

Die rohen Dinitrobenzoate wurden in 25 ml Äther gelöst und durch 25 g Aluminiumoxid neutral (6% Wasser) filtriert. Den in einer Mischung von Hexan/Äther 7:3

gelösten Rückstand des Eluats chromatographierten wir an 100 g fluoreszierendem Kieselgel der Korngröße 0.05 - 0.2 mm (Säule 60 x 2 cm). Es wurde mit 100 ml Hexan/Äther 97:3 200 ml Hexan/Äther 94:6 und 1200 ml Hexan/Äther 9:1 eluiert. Das Eluat unterteilten wir in 25 Fraktionen zu 25 ml und 7 Fraktionen zu 50 ml.

4. Untersuchung der Alkohol-Fraktion auf Farnesc1

a) Dünnschichtchromatographische Untersuchung

α) Adsorptionschromatographie

Adsorbens: Kieselgel G oder Kieselgel GF₂₅₄ (Merck)

Fließmittel: Hexan/Äther 9:1 (A) oder Petroläther/Benzol 1:1 (B)⁸⁶⁾

Laufhöhe: 15 cm

Laufzeit: 75 Min.

Standardsubstanz: Buttergelb

Nachweis: 1. UV-Licht (254 mμ) bei Verwendung von Kieselgel GF₂₅₄

2. Zinn-II-chlorid(Lösung I)/Dimethylaminobenzaldehyd(Lösung II) nach BORECKY und GASPARIC⁸⁷⁾ modifiziert für die Dünnschichtchromatographie

Lösung I: 10 g Zinn-II-chlorid werden in 100 ml Aceton, das 1% conc.Salzsäure enthält, gelöst. Die Lösung muß jedesmal frisch bereitet werden.

Lösung II: 1 g Dimethylaminobenzaldehyd wird in 30 ml 95%igem Athanol gelöst, dann setzt man 30 ml conc.Salzsäure zu und verdünnt mit 180 ml redestilliertem n-Butanol. Das Reagenz ist einige Wochen haltbar.

	Mittl. R_f -Werte		Mittl. R_B -Werte	
	Laufmittel A	Laufmittel B	Laufmittel A	Laufmittel B
n-Heptanol(1)-DNB	0.39	0.28	1.26	1.45
n-Octanol(1)-DNB	0.39	0.35	1.26	1.79
Geraniol-DNB	0.36	0.23	1.14	1.20(1.26)
Nerol-DNB	0.41	0.27	1.31	1.41
Citronellol-DNB	0.38	0.26	1.23	1.34(1.69)
Farnesol-DNB	0.58/0.44	0.27/0.33	1.23/1.42	1.38/1.69

*) R_B -Werte von DHONT und DE ROOY⁸⁶⁾ ermittelt.

8) Verteilungschromatographie

Adsorbens: Kieselgel G oder Kieselgel GF₂₅₄, imprägniert
mit einer 10%igen Lösung von Paraffin fl. in
Petroläther

Fließmittel: Dimethylformamid/Methanol/Wasser 4:1:1

Laufhöhe: 12 cm

Laufzeit: 180 Min.

Standardsubstanz: Buttergelb

Nachweis: wie bei der Adsorptionschromatographie

	Mittl. R_f -Werte	Mittl. R_B -Werte
n-Heptanol(1)-DNB	0.65	0.82
n-Octanol(1)-DNB	0.61	0.77
Geraniol-DNB	0.66	0.84
Nerol-DNB	0.66	0.84
Citronellol-DNB	0.58	0.73
Farnesol-DNB	0.38	0.49

b) Gaschromatographische Untersuchung

α) Säule: 1.2 m x 4 mm, Apiezon L auf Chromosorb WS
(0.1-0.2 mm) 20%

Säulentemperatur: 180°C

Einspritztemperatur: 230°C

Strömungsgeschwindigkeit: 70 ml/Min.H₂

Papiervorschub: 0.5 cm/Min.

Einspritzmenge: 10 µl

Empfindlichkeit: 200 mA/2.5 mV

Retentionszeit des Farnesols: 7 Min.

β) Säule: 2.65 m x 4 mm, Reoplex 400 auf Chromosorb WS
(0.1-0.2 mm) 16%

Säulentemperatur: 205°C

Einspritztemperatur: 255°C

Strömungsgeschwindigkeit: 60 ml/MinH₂

Papiervorschub: 0.5 cm/Min.

Einspritzmenge: 10 µl

Empfindlichkeit: 200 mA/2.5 mV

Retentionszeit des Farnesols: 5 Min. 36 Sek.

X. Untersuchung der Ester

1. Abtrennung der Ester

20 ml einer Chloroformlösung von 10 g einer Fraktion, die tertiäre Alkohole und Ester enthielt (Fraktion V, Schema 1, S.4) chromatographierten wir an 100 g Kieselgel (0.2-0.5 mm) (Säule 60 x 3 cm) mit dem Elutionsmittel Chloroform p.a.. Das Eluat unterteilte man in 10 Fraktionen zu 50 ml. Die gesamten Fraktionen wurden zusammengefaßt und im Vakuum bei Zimmertemperatur eingedampft.

Ausbeute: 1.5 g (Ester)

Anschließend wurde die Säule mit 1000 ml Äther eluiert und das Eluat im Vakuum bei Zimmertemperatur eingedampft.

Ausbeute: 7.0 g (tertiäre Alkohole)

2. Nachweis von Farnesol

a) Verseifung

0.5 g der Ester-Fraktion wurden mit 10 ml methanolischer Kalilauge, die aus 10 g Kaliumhydroxid, 10 ml Wasser und 100 ml Methanol p.a. bereitet wurde, 12 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Nach beendiger Verseifung wurde mit 100 ml Wasser verdünnt und 3mal vorsichtig mit je 50 ml Petroläther ausgeschüttelt. Die Petrolätherphase wusch man anschließend mit 10%iger Weinsäurelösung und Wasser, trocknete mit Natriumsulfat und dampfte im Vakuum bei Zimmertemperatur ein.

Ausbeute: 0.3 g

b) Phthalisierung

0.3 g Alkohole und 0.3 g phthalsäurefreies Phthalsäureanhydrid wurden in 3 ml wasserfreiem Pyridin gelöst und 24 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Anschließend spülte man die Reaktionslösung mit 20 ml Äther in einen Scheidetrichter und versetzte unter Um-

schütteln und Kühlung mit 20%iger Schwefelsäure bis zur kongosauren Reaktion der wässrigen Phase. Die Ätherphase wurde abgetrennt und die wässrige Phase noch 2mal mit je 50 ml ausgezogen. Die vereinigten Äther-Auszüge wusch man mit Wasser säurefrei und vertrieb den Äther im Vakuum bei Raumtemperatur. Der Rückstand wurde mit 10%iger Sodalösung unter leichtem Erwärmen in Lösung gebracht, die Lösung mit 50 ml Wasser verdünnt und vorsichtig 3mal mit je 50 ml Petroläther ausgeschüttelt. Die sodaalkalische Lösung säuerte man mit 10%iger Schwefelsäure bis zur kongosauren Reaktion an und schüttelte 3mal mit je 50 ml Äther aus. Nach dem Abdampfen des Äther i.V. bei Zimmertemperatur wurde der Rückstand mit 10 ml methanolischer Kalilauge 24 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Nach beendiger Verseifung verdünnten wir mit 100 ml Wasser und schüttelten 3mal mit je 50 ml Petroläther aus. Die Petrolätherphase wurde mit 10%iger Weinsäurelösung und Wasser alkalifrei gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und bei Zimmertemperatur i.V. eingedampft.

Ausbeute: 150 mg

c) Gaschromatographie

Säule: 2.65 m x 4 mm, Reoplex 400 auf Chromosorb WS (45-60 mesh) 16%

Temperatur: 205°C

Strömungsgeschwindigkeit: 60 ml/Min.H₂

Papiervorschub: 0.5 cm/Min.

Einspritzmenge: 0.5 µl

Empfindlichkeit: 200 mA/2.5 mV

Retentionszeit des Farnesols: 5 Min. 36 sec.

3. Isolierung von 2-Äthylhexanolacetat

1 g der Esterfraktion, gelöst in 5 ml Benzol, wurde an 50 g Kieselgel 0.2 - 0.5 mm chromatographiert (Säule 50 cm x 1.5 cm). Als Elutionsmittel diente Benzol. Das Eluat unterteilte man in

25 Fraktionen zu 25 ml. Die Fraktionen 9 mit 20 wurden vereinigt und i.V. bei Zimmertemperatur vom Lösungsmittel befreit. Ausbeute: 0.6 g

Säule: 3 m x 4 mm, Apiezon L auf Chromosorb WS (45-60 mesh) 20%
Temperatur: 120°C

Strömungsgeschwindigkeit: 65 ml/Min. H₂

Papiervorschub: 0.5 cm/Min.

Einspritzmenge: 0.5 µl

Empfindlichkeit: 200 mA/2.5 mV

Retentionszeit des Esters: 20 Min. 24 sec.

4. Identifizierung des 2-Äthylhexanolacetats

a) Papierchromatographie des Säurehydroxamats

2 mg Ester wurden mit 3 ml Hydroxylaminlösung versetzt und das Reaktionsprodukt auf Papier 2043 bMgl im System Amylalkohol/Eisessig/Wasser 4:1:5. chromatographiert. Die genaue Arbeitsvorschrift wurde im Kapitel Säuren beschrieben.

b) Herstellung des Toluidids

In einem trockenen 50 ml Dreihalskölbchen wurde unter Rückfluß, magnetischem Rühren und Feuchtigkeitsausschluß aus 100 mg Magnesium, 600 mg Äthylbromid, 600 mg p-Toluidin und 10 ml abs. Äther ein Bodroux-Reagenz hergestellt. Als dann wurden 500 mg Ester gelöst in 2 ml abs. Äther zugegeben und 15 Min. unter Rückfluß zum gelinden Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde mit einem Überschuß von 5% Salzsäure hydrolysiert, die ätherische Phase abgetrennt und die wässrige ausgeäthert. Die vereinigten ätherischen Auszüge wurden mit 5%iger Salzsäure kongosauer gewaschen, mit verdünnter Natriumhydrogensulfit-Lösung, verdünnter Salzsäure, Wasser, 5%iger Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser durchgeschüttelt. Der Äther wurde nach dem Trocknen mit Natriumsulfat bei Zimmertemperatur i.V. vertrieben. Der Rückstand wurde in 2 ml Benzol aufgenommen und auf einer Alumi-

niunoxid-Säule (20 g Al_2O_3 neutral, Akt. III, Woelm) chromatographiert. Als Elutionsmittel diente Benzol. Die ersten 5 Fraktionen (20 ml) enthielten die Alkoholkomponente. Die weiteren 5 Fraktionen lieferten 10 mg Toluidid vom Schmelzpunkt 151 - 152°C (Äthanol/Wasser)

$\text{C}_9\text{H}_{11}\text{O}_1\text{N}_1$	(149.0)	ber.:	C	72.45	H	7.43
		gef.:	C	72.68	H	7.99

c) Herstellung des 3,5-Dinitrobenzoates

100 mg des bei der Bodroux-Esterspaltung erhaltenen Alkohols und 150 mg 3,5-Dinitrobenzoylchlorid wurden zusammen mit 5 ml abs. Benzol und 0.5 ml abs. Pyridin 1 Stunde lang im Sieden gehalten. Nach dem Abkühlen wurde das Reaktionsgemisch mit 30 ml Äther in einen Scheidetrichter gespült, die ätherische Phase abgetrennt und die wässrige Phase 2mal ausgeäthert. Die vereinigten Äther-Auszüge wusch man mit 10%-iger Schwefelsäure, 10%-iger Sodalösung und Wasser. Nach dem Trocknen mit Natriumsulfat wurde die ätherische Lösung auf etwa 10 ml eingeeengt und über 10 g Aluminiumoxid neutral (3% Wasser) filtriert. Das Derivat konnte nicht kristallin erhalten werden.

Ausbeute: 150 mg.

d) Herstellung des 4 -Nitro-azobenzolcarbonsäure-(4)-chlorids (NABS-Chlorid)

Das Reagenz wurde nach der Vorschrift von HECKER⁶⁸⁾ dargestellt.

e) Herstellung des NABS-Esters

55 mg Alkohol, 138.9 mg NABS-Chlorid, 1 ml trockenes Pyridin und 20 ml absolutes Benzol wurden zusammen 30 Min. unter gelindem Sieden gehalten. Nach 12stündigem Stehenlassen spülte man die Reagenzlösung mit einer Mischung von Benzol/Äther 1:1 in einen Scheidetrichter und schüttelte mit einer Mi-

schung von 1 N Schwefelsäure und Wasser 1:2 kräftig durch. Anschließend befreiten wir die Lösung vom ausgefallenen Niederschlag durch Filtrieren durch eine G₃-Filternutsche und wuschen den Niederschlag mit der Benzol/Äther-Mischung nach. Die vereinigten Filtrate dampfte man nach dem Trocknen mit Natriumsulfat im Vakuum bei Zimmertemperatur zur Trockne ein. Der Rückstand wurde in 10 ml Benzol/Äther-Gemisch 1:1 aufgenommen und in 15 g Aluminiumoxid neutral (3% Wasser) mit Benzin (Sp. 50 - 70°C)/Äther 9.5:0.5 chromatographiert. Der Abdampfrückstand des Eluats kristallisierte aus Hexan in orangefarbenen Plättchen vom Schmelzpunkt 99 - 100°C. Der Mischschmelzpunkt des NABS-Esters zeigte mit authentischem 2-Äthylhexanol-NABS- keine Depression.

$C_{21}H_{25}N_3O_4$ (383.5) ber.: C 65.78 H 6.57 N 10.96
gef.: C 65.78 H 6.39 N 10.99

f) UV-spektrophotometrische Molekulargewichtsbestimmung des NABS-Esters

Der NABS-Ester wurde in 95%igem Äthanol (UVASOL Merck) gelöst und die Extinktion bei 332 mμ bestimmt. Die Berechnung des Molekulargewichtes erfolgte nach folgender Formel:

$$M = \frac{\xi \cdot c}{E}$$

Für ξ wurde der Wert 30800⁶⁸⁾ zugrunde gelegt.

1. Wert	2. Wert	3. Wert
c: 1.156 mg/100 ml	c: 0.0578 mg/100 ml	c: 0.02312 mg/100 ml
E: 0.941	E: 0.469	E: 0.189
ξ : 30800	ξ : 30800	ξ : 30800
M: 377.43	M: 379.5	M: 378.5

g) Oxydation zum Aldehyd

Zu 0.3 g Alkohol, der in 3 ml Eisessig p.a. gelöst war, gaben wir tropfenweise eine Lösung von 0.45 g Chromsäureanhydrid in 10 ml Eisessig p.a. zu. Anschließend wurde die Reaktionsmischung für 30 Min. auf das siedende Wasserbad gebracht. Nach dem Erkalten verdünnte man mit 80 ml Wasser und schüttelte 2mal mit je 50 ml Petroläther aus. Die Petrolätherphase wurde mit 10%iger Natriumcarbonatlösung und Wasser gewaschen und nach dem Trocknen mit Natriumsulfat i.V. bei Zimmertemperatur eingedampft.

Ausbeute: 120 mg.

h) Herstellung des Semicarbazons

Eine Lösung von 120 mg Carbonylverbindung in 1 ml 95%igem Äthanol p.a. versetzte man mit einer Lösung von 100 mg Semicarbazid-Hydrochlorid p.a. und 150 mg Natriumacetat krist. p.a. in 0.5 ml Wasser. Die Reaktionsmischung erhitze man 1 Stunde lang am Rückfluß. Nach dem Erkalten wurde der Äthanol vorsichtig i.V. bei Zimmertemperatur vertrieben und die wässrige Phase ausgeäthert. Nach dem Vertreiben des Äthers wurde der Rückstand in 3 ml Chloroform p.a. aufgenommen und an 10 g Kieselgel 0.2 - 0.5 mm mit Chloroform p.a./Methanol 9.5:0.5 als Elutionsmittel chromatographiert. Das Eluat unterteilte man in 20 Fraktionen zu 10 ml. Die Fraktionen 8 - 16 enthielten insgesamt 30 mg Semicarbazon vom Schmelzpunkt 253°C (wässriger Äthanol).

i) Herstellung des 2,4-Dinitrophenylhydrazons

30 mg Semicarbazon und 50 mg fein gepulvertes 2,4-Dinitrophenylhydrazin wurden mit 1 ml 95%igem Äthanol, der 0.03 ml 36%ige Salzsäure enthielt, versetzt. Anschließend erhitzen wir die Mischung 30 Min. lang am Rückfluß und dampften nach dem Abkühlen zur Trockene ein. Der Rückstand wurde mehrmals mit kaltem Benzol extrahiert und die vereinigten Benzolauszüge nach dem Eindampfen in 3 ml Benzin/Äther-Gemisch 9:1

aufgenommen und an 10 g Aluminiumoxid neutral (3% Wasser) mit Benzin (Sp. 50 - 70°C)/Äther 9:1 chromatographiert. Den Abdampfrückstand des Eluats kristallisierten wir einmal aus 95%igem Äthanol um. Wir erhielten ein 2,4-Dinitrophenylhydrazon vom Schmelzpunkt 126°C, das im Mischschmelzpunkt mit authentischem 2-Äthylhexanal-DNPH keine Depression aufwies. Ausbeute: 20 mg.

UV-Spektrum in Isooctan (Uvasol):

$$\lambda_{\max} = 339 \text{ m}\mu \quad (\log \epsilon \text{ 4.35})$$

$\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_4$	(308.3)	ber.: C 54.53	H 6.54	N 18.17
		gef.: C 54.75	H 6.59	N 18.31

k) Oxydation zur Carbonsäure

Zu einem Gemisch von 30 mg Aldehyd in 0.7 ml Äthanol und 80 mg Silbernitrat in 0.4 ml Wasser fügte man unter magnetischem Rühren eine Lösung von 37 mg Natriumhydroxid in 1.5 ml Wasser tropfenweise im Laufe von 30 Min. hinzu. Anschließend ließ man unter ständigem Rühren 12 Stunden bei Zimmertemperatur stehen. Nach beendeter Reaktion wurde vom abgeschiedenen Silberoxid abzentrifugiert, das Silberoxid mit Äthanol und Wasser ausgezogen und die vereinigten klaren Lösungen 2mal mit Petroläther ausgeschüttelt. Die wässrig-alkalische Phase wurde mit 10%iger Schwefelsäure bis zur kongosauren Reaktion der Lösung angesäuert und 2mal mit je 25 ml Petroläther ausgeschüttelt. Die Petrolätherphase wurde mit Wasser alkalifrei gewaschen und nach dem Trocknen mit Natriumsulfat auf etwa 5 ml eingengt. Zu dieser Lösung fügte man eine frisch bereitete ätherische Diazomethanlösung bis zur bleibenden Gelbfärbung hinzu. Nach einer Reaktionszeit von 30 Min. wurde die Lösung i.V. bei Zimmertemperatur eingengt.

Ausbeute: 20 mg.

5. Dünnschichtchromatographische Überprüfung

a) Acetoluidid und 2-Äthylhexanol

Adsorbens: Kieselgel GF₂₅₄

Fließmittel: Chloroform p.a.

Laufhöhe: 15 cm

Laufzeit: 75 Min.

Nachweis: UV-Licht (254 mμ) für das Toluidid

1%ige Vanillin-Schwefelsäure für das 2-Äthylhexanol

Mittl. R_F -Werte:	Toluidid	0.09
	2-Äthylhexanol	0.33

b) NABS-Ester

Adsorbens: Kieselgel G

Fließmittel: Benzol/Cyclohexan 1:1⁶⁹⁾

Laufhöhe: 15 cm

Laufzeit: 75 Min.

Standardsubstanz: Buttergelb

Nachweis: Tageslicht oder UV-Licht (350 mμ)

	Mittl. R_F -Werte	Mittl. R_B -Werte
2-Äthylhexanol-NABS	0.28	1.00

c) 2,4-Dinitrophenylhydrazon

Adsorbens: Kieselgel G

Fließmittel: Hexan/Äther 9:1

Laufhöhe: 15 cm

Laufzeit: 75 Min.

Standardsubstanz: Buttergelb

Nachweis: Tageslicht oder UV-Licht (350 mμ)

	Mittl. R_f -Werte	Mittl. R_B -Werte
2-Äthylhexanal-DNPH	0.35	1.18
n-Octanal-DNPH	0.23	0.78
n-Nonanal-DNPH	0.25	0.82
2-Octanon-DNPH	0.30	1.00
3-Octanon-DNPH	0.37	1.22
2-Nonanon-DNPH	0.30	1.00
3-Nonanon-DNPH	0.38	1.27
2-Decanon-DNPH	0.31	1.07
2-Tridecanon-DNPH	0.34	1.13

Adsorbens: Kieselgel G, imprägniert mit 10% Paraffin fl. in
Petroläther (v/v)

Laufhöhe: 12 cm

Laufzeit: 180 Min.

Standardsubstanz: Buttergelb

Nachweis: Tageslicht oder UV-Licht (350 m μ)

	Mittl. R_f -Werte	Mittl. R_B -Werte
2-Äthylhexanal-DNPH	0.68	0.84
n-Octanol-DNPH	0.65	0.80
n-Nonanal-DNPH	0.58	0.72
2-Octanon-DNPH	0.58	0.72
3-Octanon-DNPH	0.57	0.71
2-Nonanon-DNPH	0.53	0.66
3-Nonanon-DNPH	0.52	0.65
2-Decanon-DNPH	0.47	0.58
2-Tridecanon-DNPH	0.22	0.27

6. Gaschromatographische Überprüfung

a) Ester

Säule: 3 m x 4 mm, Apiezon L auf Chromosorb WS (45-60 mesh)
20%

Temperatur: 120°C

Strömungsgeschwindigkeit: 65 ml/Min.H₂

Papiervorschub: 0.5 cm/Min.

Einspritzmenge: 0.5 µl

Empfindlichkeit: 200 mA/2.5 mV

b) Alkohole

Säule: 3 m x 4 mm, Apiezon L auf Chromosorb WS (45-60 mesh)
20%

Temperatur: 140°C

Strömungsgeschwindigkeit: 60 ml/Min.H₂

Papiervorschub: 0.5 cm/Min.

Einspritzmenge: 0.5 - 1 µl

Empfindlichkeit: 200 mA/2.5 mV

relative Retentionsvolumina, bezogen auf n-Octanol(1) x
1000:

n-Heptanol(1): 554

2-Äthylhexanol: 797

n-Octanol-(1): 1000

Säule: 3 m x 4 mm, Reoplex 400 auf Chromosorb WS (45-60
mesh) 20%

Temperatur: 140°C

Strömungsgeschwindigkeit: 76 ml/Min.H₂

Papiervorschub: 0.5 cm/Min.

Einspritzmenge: 0.5 - 1 µl

Empfindlichkeit: 200 mA/2.5 mV

relative Retentionsvolumina, bezogen auf n-Octanol(1) x
1000:

n-Heptanol-(1): 643

2-Äthylhexanol-(1): 755

n-Octanol-(1): 1000

c) Aldehyde und Ketone

Säule: 1.2 m x 4 mm, Apiezon L auf Chromosorb WS (45-60 mesh) 20%

Temperatur: 125°C

Strömungsgeschwindigkeit: 47 ml/Min.H₂

Papiervorschub: 0.5 cm/Min.

Einspritzmenge: 0.5 µl

Empfindlichkeit: 200 mA/2.5 mV

relative Retentionsvolumina, bezogen auf n-Octanal(1) x 1000:

n-Heptanal:	531
2-Äthylhexanal:	749
n-Octanal:	1000
n-Nonanal:	1906
2-Octanon:	844
2-Nonanon:	1313
2-Decanon:	3125
3-Octanon:	969
3-Nonanon:	1781
3-Decanon:	3344

d) Carbonsäuremethylester

Säule: 3 m x 4 mm, Reoplex 400 auf Chromosorb WS (45-60 mesh) 20%

Temperatur: 140°C

Strömungsgeschwindigkeit: 70 ml/Min.H₂

Papiervorschub: 0.5 cm/Min.

Einspritzmenge: 0.5 µl

Empfindlichkeit: 200 mA/2.5 mV

relative Retentionsvolumina, bezogen auf Caprylsäuremethylester x 1000:

Capronsäuremethylester:	400
2-Äthylcapronsäuremethylester:	520
Octanthsäuremethylester:	620
Caprylsäuremethylester:	1000

XI. Untersuchung der tertiären Alkohole

1. Herstellung der 3,5-Dinitrobenzoate

7 g der nach Säulenchromatographie an Kieselgel (2.81) erhaltenen tertiären Alkohole wurden in 50 ml abs. Pyridin gelöst und mit einer Lösung von 14 g 3,5-Dinitrobenzoylchlorid in 100 ml abs. Benzol unter Kühlung versetzt. Nach 24stündigem Stehenlassen des Reaktionsgemisches bei Zimmertemperatur verdünnte man mit 300 ml Äther. Zur Entfernung des Pyridins wurde die Ätherphase mit etwa 300 ml 10%iger Schwefelsäure unter Kühlung geschüttelt und anschließend mit 10%iger Sodalösung und Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen der Ätherphase mit Natriumsulfat engte man auf etwa 50 ml ein und filtrierte durch 50 g Aluminiumoxid neutral (6% Wasser).

Ausbeute: 10 g.

2. Fraktionierung der 3,5-Dinitrobenzoate

Einsatzmenge: 10 g 3,5-Dinitrobenzoate (erhalten unter XI. 2.) gelöst in 20 ml Benzin.

Säule: 60 x 2 cm, 120 g fluoreszierendes Kieselgel (0.05-0.2 mm)

Elutionsmittel: Benzin/Äther 98:2 Vorlauf: 500 ml

35 Fraktionen zu 25 ml

Äther

15 Fraktionen zu 25 ml

Fraktion 1 bis 3	0.06 g
Fraktion 4 bis 5	0.15 g
Fraktion 6 bis 7	0.10 g
Fraktion 8 bis 10	0.18 g
Fraktion 11 bis 15	1.2 g
Fraktion 16 bis 20	0.80 g
Fraktion 21 bis 25	1.20 g
Fraktion 26 bis 32	0.70 g
Fraktion 33 bis 41	0.05 g
Fraktion 42 bis 50	2.10 g

3. Untersuchung der Fraktion 4 bis 5

Die Fraktion 4 bis 5 wurde zur Trockene gebracht und der Rückstand einmal aus Benzin umkristallisiert. Die gelblich-weißen Plättchen schmolzen bei 120 - 122°C. Der Mischschmelzpunkt mit 4-Terpineol-DNB zeigte keine Depression. Ebenso wies das IR-Überlagerungsspektrum (Abb.37, S.65) keine Abweichungen auf.

$C_{17}H_{20}N_2O_6$	(348.4)	ber.:	C	58.61	H	5.79
		gef.:	C	58.82	H	6.20

4. Untersuchung der Fraktion 11 bis 15

a) Verseifung

1.2 g des Abdampfrückstandes der Fraktion 11 bis 15 wurde in 2 ml Methanol p.a. gelöst, mit 2.2 ml Lauge (10 g KOH, 100 ml Methanol p.a., 10 ml H_2O) versetzt und 8 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Alsdann verdünnte man mit 30 ml Wasser und schüttelte 3mal mit je 50 ml Petroläther aus. Die Petrolätherphase wurde mit 10%iger Citronensäurelösung und Wasser gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum bei Zimmertemperatur eingedampft.

Ausbeute: 0.5 g.

b) Trennung des Alkoholgemisches

Auf einer Säule von 1.5 cm Durchmesser und 50 cm Füllhöhe, die 20 g Kieselgel (0.05 - 0.2 mm) enthielt, brachte man 0.5 g Alkoholgemisch, gelöst in 2 ml Benzin auf. Als Elutionsmittel diente Benzin/Äther 9:1. Das Eluat wurde in 50 Fraktionen zu 10 ml unterteilt. Die Fraktionen 19 bis 30 sowie 38 bis 42 waren gaschromatographisch einheitlich. Die beiden Fraktionen wurden bei Zimmertemperatur vom Lösungsmittel befreit.

Ausbeute (Fraktion 19 bis 30)/ 0.2 g

Ausbeute (Fraktion 38 bis 42): 0.075 g.

c) Identifizierung von Linalool

0.2 g des aus der Fraktion 19 bis 30 erhaltenen Rückstandes löste man in 0.4 ml abs. Pyridin und versetzte mit einer Lösung von 0.22 g p-Nitrobenzoylchlorid in 2 ml abs. Benzol. Nach 24stündigem Stehenlassen bei Zimmertemperatur verdünnte man mit 10 ml Äther. Zur Entfernung des Pyridins wurde die Ätherphase mit etwa 5 ml 10%iger Schwefelsäure durchgeschüttelt und anschließend mit 10%iger Sodalösung und Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen der Ätherphase mit Natriumsulfat wurde auf etwa 2 ml eingeeengt und durch 10 g Aluminiumoxid neutral (6% Wasser) filtriert.

Den Abdampfrückstand kristallisierte man 2mal aus Methanol p.a. um. Die weißen Nadelchen schmolzen bei $75 - 76^{\circ}\text{C}$. Das IR-Überlagerungsspektrum (Abb. 38, S. 66), sowie die CH-Werte stimmten mit authentischem Linalool-NB überein. Der Mischschmelzpunkt mit l-Linalool-NB zeigte keine Depression.

$\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{O}$	(303.4)	ber.:	C 67.31	H 6.98
		gef.:	C 67.70	H 7.28

d) Identifizierung von α -Terpineol

0.075 g des aus der Fraktion 38 bis 42 erhaltenen Rückstandes wurden in 0.4 ml abs. Pyridin gelöst und mit einer Lösung von 0.1 g 3,5-Dinitrobenzoylchlorid in 0.4 ml abs. Benzol versetzt. Nach 24stündigem Stehenlassen bei Zimmertemperatur verdünnte man mit 4 ml Äther. Zur Entfernung des Pyridins wurde die Ätherphase mit etwa 1 ml 10%iger Schwefelsäure durchgeschüttelt und anschließend mit 10%iger Natriumkarbonatlösung und Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen der Ätherphase mit Natriumsulfat filtrierten wir die Lösung durch 5 g Aluminiumoxid neutral (6% Wasser).

Den Rückstand des Eluats kristallisierte man einmal aus Benzin und einmal aus Methanol p.a. um. Die feinen weißen Nadeln schmolzen bei 100°C. Das IR-Überlagerungsspektrum (Abb. 39, S. 67), sowie die CH-Werte stimmten mit authentischem α -Terpineol-DNB überein. Der Mischschmelzpunkt mit 1- α -Terpineol zeigte keine Depression.

$C_{17}H_{20}N_2O_6$	(348.4)	ber.:	C	58.61	H	5.79
		gef.:	C	58.57	H	6.13

5. Untersuchung der Fraktion 21 bis 32

a) Verseifung

0.7 g des Abdampfrückstandes der Fraktion 25 bis 32 (die Fraktionen 21 bis 24 waren weniger rein und wurden bisher nicht zur Untersuchung verwendet), wurden in 2 ml Methanol p.a. gelöst, mit 2 ml Lauge (10 g KOH, 100 ml Methanol p.a., 10 ml H_2O) versetzt und 8 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Nach beendigter Verseifung verdünnte man mit 30 ml Wasser und schüttelte 3mal mit je 50 ml Petroläther aus. Die Petrolätherphase wurde mit 10%iger Citronensäurelösung und Wasser gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum bei Zimmertemperatur eingedampft.
Ausbeute: 0.3 g.

b) Reinigung

0.3 g des Verseifungsproduktes, gelöst in 1 ml Benzin wurden an 10 g Kieselgel (0.05-0.2 mm) getrennt. Als Elutionsmittel diente Benzin/Äther 9:1. Das Eluat wurde in 20 Fraktionen zu 10 ml unterteilt. Die Fraktionen 10 bis 13 enthielten den Alkohol Peak 8 (EGSS-X). Zur Aufnahme des IR- und UV-Spektrums dienten die gaschromatographisch reinen Fraktionen 12 bis 13 (Abb. 40, S. 68). Die IR- und UV-spektroskopischen Daten sind folgende:

IR-Spektrum:

Tertiäre Alkoholgruppe

OH-Valenzschwingung (ν OH): 3413 cm^{-1}

Kopplung der OH-Deformationsschwingung mit der C-O-Valenzschwingung: 1111 cm^{-1}

Vinylgruppe

C=C-Valenzschwingung (ω C=C): 1642 cm^{-1}

CH-Valenzschwingung (ν CH): 3086 cm^{-1}

CH-Deformationsschwingung (bending out of plane) (γ CH): 920 cm^{-1}

Konjugation der Doppelbindung der Vinylgruppe zu einer zweiten Doppelbindung

C=C-Valenzschwingung (ω C=C): 1610 cm^{-1}

trans-Doppelbindung

CH-Deformationsschwingung (bending out of plane) (γ CH): 965 cm^{-1}

UV-Spektrum in Isooctan (Uvasol):

$$\lambda_{\text{max}} = 230 \text{ m}\mu \quad (\log \epsilon \ 4.23)$$

c) Hydrierung

Zu 0.03 g Palladium/Tierkohle 10%ig und 10 ml Methanol p.a. wurde nach Vorhydrierung des Katalysators eine Lösung von 0.15 g des aus den Fraktionen 10 bis 13 erhaltenen Alkohols (IX. 5.c) in 5 ml Methanol p.a. hinzugefügt. Nach einem Verbrauch von 30 ml Wasserstoff filtrierte man vom Katalysator ab und wusch mit 5 ml Methanol p.a. nach. Nach dem Verdünnen mit 30 ml Wasser wurde 3mal mit je 20 ml Petroläther ausgeschüttelt, mit Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum bei Zimmertemperatur eingedampft.

Ausbeute: 0.075 g.

d) Identifizierung des Hydrierungsproduktes

0.075 g des Hydrierungsproduktes wurden in 0.4 ml abs. Pyridin gelöst und mit einer Lösung von 0.1 g 3,5-Dinitrobenzoylchlorid in 0.4 ml abs. Benzol versetzt. Nach 24stündigem Stehenlassen bei Zimmertemperatur verdünnte man mit 4 ml Äther. Zur Entfernung des Pyridins wurde die Ätherphase mit etwa 1 ml 10%iger Schwefelsäure durchgeschüttelt und anschließend mit 10%iger Sodalösung und Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen mit Natriumsulfat wurde der Äther abgedampft.

Ausbeute: 0.066 g

Der Abdampfrückstand wurde in 0.5 ml Benzin gelöst und an 10 g fluoreszierendem Kieselgel (0.05 - 0.2 mm) aufgetrennt. Als Elutionsmittel diente Benzin/Äther 98:2. Das Eluat wurde in 10 Fraktionen zu 10 ml unterteilt. Der Abdampfrückstand der Fraktionen 7 bis 9 kristallisierte man einmal aus Benzin um. Die gelblich-weißen Plättchen schmolzen bei 45°C. Das IR-Überlagerungsspektrum (Abb. 41, S. 69), sowie der Mischschmelzpunkt stimmten mit authentischem Tetrahydrolinalool-DNE überein.

6. Dünnschichtchromatographische Untersuchungen

a) 3,5-Dinitrobenzoate

Adsorbens: Kieselgel GF₂₅₄ oder Kieselgel G (Merck)

Fließmittel: Hexan/Äther 9:1 (A) oder Petroläther/
Benzol 1:1 (B)

Laufhöhe: 15 cm

Laufzeit: 75 Min.

Standardsubstanz: Buttergelb

Nachweis: siehe unter Kapitel IX., 4.a)α), S. 104

	Mittl. R_f -Werte		Mittl. R_f -Werte	
	Laufmittel A	Laufmittel B	Laufmittel A	Laufmittel B
tetrahydrolinalool-DNB	0.58	-	1.88	-
linalool-DNB	0.43	0.32	1.36	1.52
myrcenol-DNB	0.43	0.40	1.36	1.80
-Terpineol-DNB	0.43	0.37	1.36	1.64
-Terpinenol-DNB	0.55	0.43	1.77	2.00
nerolidol-DNB	0.49	0.37	1.55	1.64

b) Freie Alkohole

Adsorbens: Kieselgel G (Merck)

Fließmittel: Benzin/Äther 1:1 (A) oder Benzol/Äthylacetat 95:5 (B)

Laufhöhe: 15 cm

Laufzeit: 60 Min.

Nachweis: Anisaldehyd-Schwefelsäure (8.5 ml Methanol p.a., 0.5 ml Anisaldehyd, 1 ml Schwefelsäure p.a.) bei 110°C.

	Mittl. R_f -Werte	
	Laufmittel A	Laufmittel B
α -Terpineol	0.45	0.20
Linalool	0.59	0.32
Myrcenol	0.41	0.19
Nerolidol	0.63	0.38
4-Terpineol	0.59	0.38
Alkohol Peak 8 (EGSS-X)	0.53	0.29

Die tertiären Alkohole ergaben unterschiedliche Färbungen:

α -Terpineol: blauviolett, Linalool: graugrün, 4-Terpineol: blauviolett, Myrcenol: graugrün, Nerolidol: graugrün, Alkohol Peak 8: violett.

7. Gaschromatographische Untersuchungen

- a) Säule: 2 m x 4 mm, EGSS-X auf Gaschrom P (100-120 mesh)
15%

Säulentemperatur: 134°C

Einspritztemperatur: 165°C

Detektortemperatur: 169°C

Auslaßtemperatur: 161°C

Strömungsgeschwindigkeit: 60 ml/Min.Argon

Papiervorschub: 1.016 cm/Min.

Detektorempfindlichkeit: 500 V

Schreiberempfindlichkeit: 3×10^{-8} A

Einspritzmenge: 1 µl einer 10%igen Lösung

- b) Säule: 2 m x 4 mm, Apiezon L auf Chromosorb WS (45-60 mesh) 16%

Säulentemperatur: 134°C

Einspritztemperatur: 165°C

Detektortemperatur: 169°C

Auslaßtemperatur: 161°C

Strömungsgeschwindigkeit: 60 ml/Min.Argon

Papiervorschub: 1.016 cm/Min.

Detektorempfindlichkeit: 500 V

Schreiberempfindlichkeit: 1×10^{-7} A

Einspritzmenge: 0.5 µl einer 10%igen Lösung

In Tabelle 15 sind die relativen Retentionsvolumina, bezogen auf 4-Terpinenol, der tertiären Alkohole des Lindenblütenöls zusammengestellt.

T a b e l l e 15

Relative Retentionsvolumina, bezogen auf 4-Terpinenol ($\times 10^3$)
der tertiären Alkohole des Lindenblütenöls

Apiezon L		EGSS-X	
Peak	V _{rel}	Peak	V _{rel}
1	48	1	163
2	251	2	233
3	311	3	326
4	359	4	407
5	419	5	535
6	461	6	651
7	754	7	802
8	826	8	1000
9	934	9	1416
10	1000	10	1512
11	1125	11	2884
12	-	12	3349

Folgende Tabelle 16 beinhaltet die Siedepunkte und die relativen Retentionsvolumina, bezogen auf 4-Terpinenol ($\times 10^3$), der zum Vergleich benutzten Testsubstanzen.

T a b e l l e 16

Verbindung	Siedepunkt ⁵²⁾ 760 mm Hg	stationäre Phase	
		Apiezon L	EGSS-X
Tetrahydrolinalool	195.5	305	348
Linalool	198-199	450	628
Myrcenol	99-101(10 mm)	532	942
4-Terpinenol	209-212	1000	1000
α -Terpineol	209-210	1114	1435

8. Herkunft und Herstellung der Testsubstanzen

T a b e l l e 17

Herkunft der tertiären Alkohole

tertiärer Alkohol	Herkunft
Tetrahydrolinalool	Fluka AG, Buchs (Schweiz)
1-Linalool	Boure Bertrand Fils et Justin Dupont, Paris (Frankreich)
1- α -Terpineol	Dr. Theodor Schuchardt GmbH, München
4-Terpinenol	L. Light u. Co, London (England)
Myrcenol	Hydratation von Myrcen mit Essigsäure ⁸⁸⁾

Myrcenol: Nach HOULIKAN, LEVY und MAYER⁸⁸⁾ wurde Myrcen mit Essigsäure unter Zusatz einer geringen Menge Schwefelsäure zum Myrcenylacetat hydradisiert, das mit alkoholischer Kalilauge verseift wurde. Das Verseifungsprodukt befreiten wir von den Terpenkohlenwasserstoffen durch Chromatographie an Kieselgel (Petroläther als Elutionsmittel). Anschließend reinigte man den Alkohol durch präparative Gaschromatographie an einer Polyäthylenglykol 4000-Säule bei 160°C.

ALLGEMEINER TEIL

Dünnschichtchromatographie von Senfölen und Senfölglykosiden

Seit dem Altertum finden senfölführende Drogen Anwendung in der Volksmedizin. Bereits die Botanikerärzte des Mittelalters wie MATTHIOLUS, HIERONYMUS BOCK und MATTHIAS DE LOBEL beschreiben eine Reihe von Pflanzen, die bei Infektionen der Harnwege und zur Wundreinigung verwendet wurden. Die Aufzählung war bereits so vollkommen, daß sich bei der Nachprüfung nicht weniger als 65% der dort angegebenen Pflanzen als antibiotisch wirksam erwiesen.

Ogleich die Senföle und ihre entsprechenden Glukoside vorwiegend in Cruciferen gefunden wurden, ist ihr Vorkommen keineswegs auf diese Pflanzenfamilie beschränkt. In taxonomischer Hinsicht mag es nicht überraschen, daß in Capparidaceen, Moringaceen und Resedaceen, die wie die Cruciferen zur Ordnung der Rhoeadales gehören, ebenfalls Senfölglykoside entdeckt wurden. Unerwartet jedoch war das Vorhandensein der Glukoside in Familien wie den Caricaceen, Euphorbiaceen, Limnanthaceen, Phytolaccaceen, Plantaginaceen, Salvoradaceen und Tropaeolaceen, die nach heute gültiger Auffassung taxonomisch zu den Rhoeadales in keiner Beziehung stehen.

Exakte pharmakologische Versuche der Senföle zeigten bei perkutaner Anwendung eine Änderung der Kapillarresistenz, der Kapillarpermeabilität, sowie eine Erhöhung der Leukocytenzahl im peripheren Blut⁸⁹⁾⁹⁰⁾. GERHARD⁹¹⁾ untersuchte die hyperämisierende Wirkung der Senföle in Abhängigkeit von ihren Molekulargewichten. Der Autor stellte fest, daß die niedrigmolekularen Öle stärker als die höhermolekularen wirken, sofern die behandelten Hautstellen luftdicht abgedeckt wurden. In emulgierter Form, ohne Abdeckung wird der stärkste Reiz von Benzylsenföl hervorgerufen.

Mikrobiologische Versuche ergaben, daß alle bisher bekannten Senföle antibiotische Wirksamkeit besitzen. Das bekannteste Senföl, das Allylsenföl, ist nur von geringer therapeutischer Bedeu-

tung, da es bei relativ niedriger antibiotischer Aktivität in höheren Dosen eine starke Reizwirkung auf die Schleimhäute ausübt.

Wesentlich günstiger für die arzneiliche Verwendung erwiesen sich dagegen die Senföle aus der Gartenkresse (*Lepidium sativum* L.), der Kapuzinerkresse (*Tropaeolum majus* L.), dem weißen Senf (*Sinapis alba* L.) und dem Meerrettich (*Cochlearia armoracia* L.). Für das Senföl der Kapuzinerkresse liegt die erforderliche antibiotische Wirkstoffkonzentration im Durchschnitt bei $20 \text{ } \gamma/\text{cm}^3$ ⁹²⁾. Im Gegensatz zum Penicillin beeinflusst das Senföl der Kapuzinerkresse die physiologische Darmflora nur wenig. Es zeigt bei nur langsamer Zunahme der Resistenz gegenüber anderen Antibiotica keine Kreuzresistenz. Nach den Untersuchungen von STICKL ⁹³⁾ und GERMER ⁹⁴⁾ werden die wirksamen Verbindungen nicht nur über die Niere, sondern auch über die Respirationsorgane ausgeschieden. Damit eröffnet sich eine Möglichkeit, leichtere Fälle von Mandelentzündungen und Bronchitiden zu heilen.

Ähnliches gilt für die Inhaltsstoffe des Meerrettichs, deren Zusammensetzung kürzlich von ISAAC und KOHLSTAEDT ⁹⁵⁾ geklärt werden konnte. Nach HALBEISEN ⁹⁶⁾ zeichnet sich das Meerrettichöl durch ein besonders breites Wirkungsspektrum gegen grampositive und gramnegative Bakterien, sowie durch eine hohe Wirkungsgrenze aus. Nach KEMKES und KIENHOLZ ⁹⁷⁾, sowie WINTER und HORNBORSTEL ⁹⁸⁾ ist die antibakterielle Wirkung des Meerrettichöls auf grampositive Keime im wesentlichen dem Phenyläthylsenföl zuzuschreiben. Beachtlich ist der von WINTER ⁹⁹⁾ beobachtete starke Effekt auf *Pseudomonas aeruginosa*. Im Gegensatz dazu versagen hier die therapeutisch üblichen Antibiotica wie auch der Wirkstoff der Kapuzinerkresse. In jüngster Zeit berichteten SCHINDLER, ZIPP und MARTH ¹⁰⁰⁾ sowie MÖHWALD und GALLENKEMPER ¹⁰¹⁾ über eine günstige der Sulfonamidtherapie nahekommende Wirkung eines Meerrettichpräparates, das bei der Behandlung von Blasen- und Niereninfektionen gute Erfolge zeigte.

Um eine sinnvolle Therapie mit Senfölen durchführen zu können, müssen entsprechend hohe Wirkstoffkonzentrationen zur Anwendung kommen. Dies gelingt nur, wenn man von einwandfrei standardisierten Zubereitungen ausgeht.

Identifizierungs- und quantitative Bestimmungsmethoden für

Senföle

1. Quantitative Bestimmungsmethoden

Die älteren Verfahren zur Bestimmung von Isothiocyanaten erfolgen entweder durch gravimetrische Bestimmung¹⁰²⁾ oder durch Titration ihrer Thioharnstoffe. So beschreiben das deutsche (DAB 6), belgische (PH.Bel.), französische (Codex Gall. VI) und jugoslawische (PH.Jug. II) Arzneibuch beim schwarzen Senf eine argentometrische Titration des mit Ammoniak zum Thioharnstoff umgesetzten Allylsenföls. Das oesterreichische (PH.Austr. IX) und das Schweizer Arzneibuch (PH.H.V.) bedienen sich zur Bestimmung des Allylsenföls eines jodometrischen Verfahrens nach MORVILLEZ und MEESEMAECKER¹⁰³⁾. Nach BÖHME¹⁰⁴⁾ kann Allylsenföls alkalimetrisch und nach WOJAHN¹⁰⁵⁾ mit alkalischer Jodlösung bestimmt werden. DIRKS¹⁰⁶⁾ und SCHLICHT¹⁰⁷⁾ bestimmen das bei der Oxydation entstehende Sulfation. FÜRST¹⁰⁸⁾ bestimmt eine Reihe von Senfölen polarographisch. In neuerer Zeit bedienen sich KJAER und Mitarb.¹⁰⁹⁾ der spektrophotometrischen Methode, da Thioharnstoffe ein ausgeprägtes Absorptionsmaximum bei 242 mμ besitzen.

Bisher liegen nur wenige Bestimmungsmethoden zur quantitativen Erfassung der im Pflanzenmaterial anwesenden Senfölglykoside vor. Sie basieren im allgemeinen darauf, daß man die durch enzymatische Spaltung gebildeten Isothiocyanate nach verschiedenen Methoden bestimmt. Wiederholte Beobachtungen zeigten jedoch, daß die enzymatische Spaltung der Senfölglykoside nur selten quantitative Ausbeuten an Senfölen lieferte. Zur Bestimmung der intakten Senfölglykoside beschrieben SCHULTZ und GMELIN¹¹⁰⁾ ein Verfahren, das auf der Spaltung der Glykoside

mittels konzentrierter Schwefelsäure und anschließender kolorimetrischer Auswertung der Glukose mit Hilfe des Anthron-Reagenzes beruht. Die Brauchbarkeit dieses Verfahrens wird allerdings dadurch eingeschränkt, daß vor der Analyse alle störenden Verunreinigungen, wie freie Zucker, Glukoside usw. durch Papier- oder Ionenaustauscherchromatographie entfernt werden müssen.

2. Bisherige chromatographische Methoden zum Nachweis der Senföle und ihrer Glukoside

Die papierchromatographische Untersuchung der freien Senföle und ihrer Glukoside hat sich als wertvolles Mittel zur Erforschung dieser Substanzgruppe erwiesen. KJAER¹¹¹⁾ trennte eine große Anzahl Senföle in Form der leicht darstellbaren und nicht flüchtigen Thioharnstoffe mit Wasser gesättigtem Chloroform, das sich unter vielen anderen Laufmittelsystemen als besonders geeignet erwies. Allerdings erfordert diese Technik eine sehr sorgfältige Arbeitsweise, insbesondere ist die Sättigung des Papiers nur unter bestimmten Maßnahmen zu erreichen. Rumänische Autoren¹¹²⁾¹¹³⁾ beschrieben einen papierchromatographische Trennung verschiedener aromatischer Isothiocyanate in Form ihrer 2,4-Dinitrophenylthiosemicarbazide, der aliphatischen Thioharnstoffe als gelbe Wismutacetatkomplexe.

Genuine Glukoside aus methanolischen Pflanzenextrakten trennten SCHULTZ und Mitarb.¹¹⁴⁻¹¹⁶⁾ auf Papier mit Butanol-Eisessig-Wasser-Gemischen und eröffneten damit Möglichkeiten zum Auffinden neuer Glukoside.

Die erhaltenen Trennungen sind allerdings nur wenig zufriedenstellend, da die Glukoside in den angegebenen Laufmitteln zu niedrige R_f -Werte und sehr geringe R_f -Unterschiede aufweisen. Außerdem wird der chromatographische Nachweis der Glukoside direkt aus den Gesamtextrakten durch Begleitstoffe des öfteren so gestört, daß ein sicherer Nachweis oftmals nicht möglich ist.

Die erstmals von KJAER und JART¹¹⁷⁾ durchgeführte gaschromatographische Analyse der Senföle bedeutet eine wesentliche Bereicherung der bisherigen chromatographischen Methoden.

3. Neue Untersuchungen

Das Ziel unserer Versuche war es, einfache, schnell durchführbare und einwandfrei reproduzierbare chromatographische Methoden zur Trennung der Senföle und ihrer Glukoside zu entwickeln, die sich zur Routineanalyse von Pflanzenextrakten und entsprechenden Arzneispezialitäten eignen.

a) Chromatographie der Senföle

Zunächst versuchten wir, die Senföle auf Kieselgeldünnschichtplatten adsorptionschromatographisch mit Benzol-Chloroform- und Petroläther-Äther-Gemischen zu trennen. Die erhaltenen Trennungen waren wenig erfolgreich, da das Adsorbens die homologen Isothiocyanate nicht zu trennen vermochte. Unsere Bemühungen, die Senföle verteilungschromatographisch auf Formamid oder Dimethylformamid imprägnierten Platten zu trennen, lieferten, infolge der leichten Flüchtigkeit dieser Substanzen, ebenfalls wenig eindeutige Ergebnisse.

b) Chromatographie der Senföle in Form ihrer Thioharnstoffe

Die Chromatographie der Thioharnstoffe auf Kieselgelplatten, die bei 105°C aktiviert waren, im System Äthylacetat/Chloroform p.a./Wasser 3:3:4 ergab hingegen ausgezeichnete Trennergebnisse. Da beim Auftragen von Substanzmengen über 20 γ die Thioharnstoffe leicht zur Schwanzbildung neigten, verwendeten wir Platten, die nur bei Zimmertemperatur getrocknet wurden. Hierdurch war die Auftrennung ohne jegliche Schwanzbildung in Mengen zwischen 5 und 50 γ möglich. Die Platten waren nach 2stündigem Trocknen über mehrere Tage hinaus verwendbar, ohne daß es zu einer Abnahme der Trennleistung kam.

In Tabelle 18 sind die mittleren R_f -Werte der Thioharnstoffe, sowie deren relative R_B -Werte, bezogen auf Allylthioharnstoff, zusammengestellt.

T a b e l l e 18

Thioharnstoffe	mittl. R_f -Wert	mittl. R_B -Wert
Methyl-	0.20	0.46
Äthyl-	0.30	0.69
Isopropyl-	0.41	0.95
Allyl-	0.43	1.00
sec.n-Butyl-	0.49	1.13
β -Phenyläthyl-	0.51	1.18
Benzyl-	0.57	1.30
Phenyl-	0.67	1.54

Zum Sichtbarmachen der Thioharnstoffe benutzten wir eine Mischung von gleichen Teilen einer wässrigen 5%igen Eisen-III-chlorid-Lösung und einer 1%igen wässrigen Kaliumferricyanid-Lösung. Die Anfärbung mit diesem Reagenz gestaltete sich bei den Thioharnstoffen noch empfindlicher als bei den Senfölen, so daß mühelos noch 5 γ Thioharnstoff nachgewiesen werden konnten.

Eine weitere Methode, um die Thioharnstoffe sichtbar zu machen, besteht darin, daß man dieselben auf einem Kieselgel mit Fluoreszenzindikator (Kieselgel Merck GF₂₅₄) chromatographiert und die Flecken unter einer kurzwelligen UV-Lampe auswertet. Es erschienen violett-schwarze Flecken auf grünlich fluoreszierendem Untergrund. Hiermit waren noch 1 γ Thioharnstoff nachweisbar. Dieses Verfahren dürfte als Grundlage für eine schnelle quantitative Bestimmung geeignet sein.

Wie die nachfolgende Abbildung 42 zeigt, lassen sich die wichtigsten Senföle in Form ihrer Thioharnstoffe nach dem beschriebenen Verfahren gut auftrennen. Sowohl die Homologen der aliphatischen Reihe vom Methyl- bis zum sec.n-Butylthioharnstoff (1 - 5) als auch die Homologen der aromatischen Reihe vom β -Phenyläthyl- bis zum Phenylthioharnstoff (6 - 9) trennen sich voneinander sehr exakt ab. Nur in der aliphatischen Reihe bereitet die Trennung des Isopropylthioharnstoffes vom Allylthioharnstoff einige Schwierigkeiten. Die aromatischen Thioharnstoffe trennen sich interessanterweise im Gegensatz zu den bei der Papierchromatographie beobachteten Gesetzmäßigkeiten in umgekehrter Reihenfolge. Phenylthioharnstoff besitzt den höchsten R_F -Wert und β -Phenyläthylthioharnstoff den tiefsten R_F -Wert. Offenbar wird durch die $-\text{CH}_2-$ bzw. $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ Gruppe zwischen Benzolring und Isothiocyanatgruppe der Mesomerieeinfluß der Isothiocyanatgruppierung auf den Aromaten teilweise bzw. vollständig aufgehoben, so daß das chromatographische Rückhaltevermögen des Aromaten voll zur Geltung kommt. Der β -Phenyläthylthioharnstoff liegt somit etwa auf der Höhe des sec.n-Butylthioharnstoffes.



Abb. 42

Dünnschichtchromatographie von Senfölen über ihre Thioharnstoff-Derivate

- | | |
|---------------------------|------------------------------|
| 1 = Th.v. Methylsenfö1 | 5 = Th.v. sec.-n-Butylsenfö1 |
| 2 = Th.v. Äthylsenfö1 | 6 = Th.v. Phenyläthylsenfö1 |
| 3 = Th.v. Isopropylsenfö1 | 7 = Th.v. Benzylsenfö1 |
| 4 = Th.v. Allylsenfö1 | 8 = Th.v. Phenylsenfö1 |

Dünnschichtplatte: Kieselgel G Merck

Fließmittel: Oberphase von Chloroform-Äthylacetat-Wasser
3:3:4

Sprühreagenz: Kaliumferricyanid 1% + Fe-III-chlorid 5% (1:1)

c) Chromatographie von senföhlhaltigen Spezialitäten

Von Arzneispezialitäten, die freie Senföle enthalten, wurden die Präparate TROMACAPS^R, TROMALYT^R-Salbe, BALSALYT^R-Salbe und REDSKIN^R untersucht. Bei den Präparaten TROMACAPS und REDSKIN konnten die Senföle direkt in der Lösung zu den Thioharnstoffen umgesetzt werden. Die Lösungsvermittler dieser Spezialitäten störten dabei nur wenig, da sie in Äthanol kaum löslich waren und daher abgetrennt werden konnten. Bei TROMAHALAT dagegen war es nötig, das Senföl vor dem Umsetzen mit Ammoniak durch eine Petroläther-Ausschüttelung anzureichern. Die durch den Stabilisator hervorgerufene Emulsionsbildung wurde durch Zusatz von Methanol beseitigt. Aus den beiden Salben erhielten wir die Isothiocyanate durch Wasserdampfdestillation.

Im folgenden Chromatogrammbild (Abb. 43) wird die Trennung der Thioharnstoffe der Arzneispezialitäten und des Meerrettichöls zusammen mit den entsprechenden Testsubstanzen gezeigt. Beim Meerrettichöl sind in Übereinstimmung mit den Angaben von ISAAC und KOHLSTAEDT⁹⁵⁾ Allyl- und β -Phenyläthylsenföl nachweisbar. Die Präparate REDSKIN und BALSALYT enthalten Allylsenföl. Die aus Kapuzinerkresse hergestellten Spezialitäten TROMACAPS, TROMALYT und TROMAHALAT wurden mit Benzylthioharnstoff verglichen.

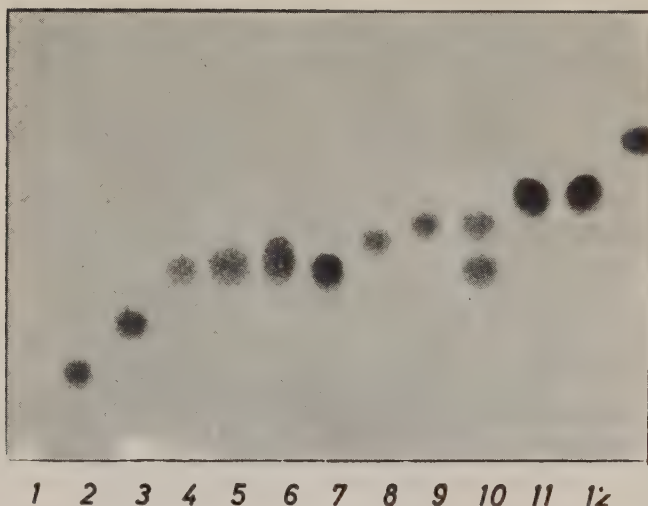


Abb. 43

Dünnschichtchromatographie von Senfölen über ihre Thioharnstoff-Derivate

- | | |
|----------------------------|--|
| 1 = Th.v. Methylsenföhl | 7 = Th.v. sec. n-Butylsenföhl |
| 2 = Th.v. Äthylsenföhl | 8 = Th.v. Phenyläthylsenföhl |
| 3 = Th.v. Isopropylsenföhl | 9 = Th.v. Cochlearia amoracia |
| 4 = Th.v. Allylsenföhl | 10 = Sp.v. Tromacaps = Tromahalat = Tromalyt |
| 5 = Sp.v. Redskin | 11 = Th.v. Benzylsenföhl |
| 6 = Sp.v. Balsalyt | 12 = Th.v. Phenylserföhl |

Dünnschichtplatte: Kieselgel G Merck

Fließmittel: Oberphase von Chloroform-Äthylacetat-Wasser (3:3:4)

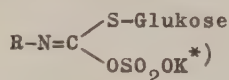
Sprühreagenz: Kaliumferricyanid 1% + Fe-III-chlorid 5% (1:1)

d) Chromatographie der Senfölglykoside

Auch die Chromatographie der Senfölglykoside erfolgte auf nicht aktivierten Kieselgelschichten. Als günstiges Laufmittel erwies sich das System n-Butanol/N-Propanol/Eisessig/Wasser 3:1:1:1. Zur Trennung gelangten die in Tabelle 19 aufgeführten Glykoside.

T a b e l l e 19

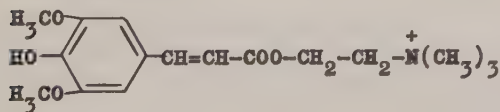
Glykosid der Grundformel



R

Glucosiberin	$\text{CH}_3-\text{S}-(\text{CH}_2)_3-$ 0
Glucoscheirolin	$\text{CH}_3-\text{SO}_2-(\text{CH}_2)_3-$
Glucocapparin	CH_3-
Sinigrin	$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-$
Sinalbin	$\text{HO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-$
Glucotropaeolin	$\text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_2-$

*) Das Senfölglykosid Sinalbin besitzt anstelle des sonst üblichen Kalium-Kations das Kation Sinapin, das chemisch einen Cholinester der Sinapinsäure darstellt und folgende Strukturformel besitzt:



Sinapinsäure

Cholin

Die R_f -Werte und relativen R_B -Werte, bezogen auf Sinigrin, sind in Tabelle 20 zusammengestellt.

T a b e l l e 20

Glukosid	Mittl. R_f -Wert	Mittl. R_B -Wert
Glucolberin	0.16	0.44
Glucocheirolin	0.25	0.69
Glucocapparin	0.26	0.70
Sinigrin	0.37	1.00
Sinalbin	0.44	1.19
Glucotropaeolin	0.48	1.30

Die von SCHULTZ und Mitarb.¹¹⁴⁾ zur Charakterisierung der Senfölglykoside angegebenen Anfärbereagenzien Silbernitrat/Kaliumdichromat, Kaliumhydroxid/Nitroprussidnatrium oder modifizierte ammoniakalische Silbernitratlösung lieferten auf Kieselgel-Platten keine zufriedenstellenden Ergebnisse. Statt dessen besprühten wir zum Sichtbarmachen der Glukoside mit 25%iger Trichloressigsäure in Chloroform und nach 20minütigem Erhitzen bei 140°C mit Kaliumferricyanid/Eisen-III-chlorid. Die Senfölglykoside waren durch intensiv blau gefärbte Flecken auf gelblichem Untergrund charakterisiert. Es waren noch 5 γ nachweisbar.

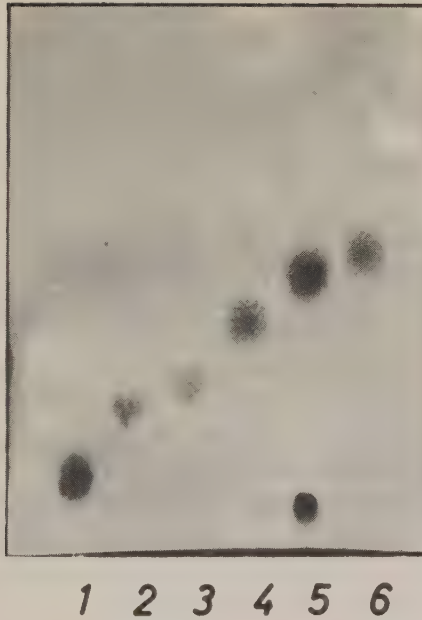


Abb. 44

Dünnschichtchromatographie von Senfölglykosiden

1 = Glucoiberin	4 = Sinigrin
2 = Glucocheirolin	5 = Sinalbin
3 = Glucocapparin	6 = Glucotropaeolin

Dünnschichtplatte: Kieselgel G Merck

Fließmittel: n-Butanol-n-Propanol-Eisessig-Wasser (3:1:1:1)

Sprühreagenz: Trichloressigsäure 25% in Chloroform + Kaliumferricyanid 1% + Fe-II-chlorid 5% (1:1)

Wie aus Abbildung 44 zu entnehmen ist, lassen sich die wichtigsten Senfölglykoside mit Ausnahme von Glucocheirolin und Glucocapparin eindeutig voneinander trennen.

Die Glykoside werden bei der chromatographischen Trennung in Glykosidanion und Kation gespalten. Diese Trennung ist besonders beim Sinalbin zu beobachten, das anstelle des sonst bei diesen Glykosiden üblichen Kaliumions den Sinapinrest trägt. Auf dem Chromatogramm sind zwei Flecken nachweisbar, von denen der eine mit R_f -Wert von 0.44 dem Glykosidanion und der andere mit dem R_f -Wert von 0.09 dem Sinapinylcholin zukommt.

Die erhaltenen R_f -Unterschiede sind im Gegensatz zu der papierchromatographischen Analyse von SCHULTZ und GMELIN¹¹⁴⁾ durchwegs höher.

Im allgemeinen gelten in der Dünnschichtchromatographie für die Lage der R_f -Werte der Glykoside ähnliche Gesetzmäßigkeiten wie in der Papierchromatographie. Der R_f -Wert des Glykosids nimmt mit der Anzahl der Kohlenstoffatome zu, während hydrophile Substituenten wie die OH-, SO₂- oder SO-Gruppe den R_f -Wert vermindern. Dabei gelang es uns, dünn-schichtchromatographisch das Glucoiberin mit einer SO-Gruppe im aliphatischen Rest vom Glucocheirolin mit einer SO₂-Gruppe im Molekül abzutrennen, was bisher papierchromatographisch nicht zu verwirklichen war. Beim Nacharbeiten der papierchromatographischen Methode von SCHULTZ¹¹⁴⁾ zur Untersuchung der methanolischen Gesamtextrakte auf Senfölglykoside mußten wir feststellen, daß in vielen Fällen, insbesondere bei Frischpflanzen-Auszügen der Nachweis der Glykoside durch Begleitstoffe erheblich gestört wurde.

Wir bemühten uns daher, die Ballaststoffe mittels Säulenchromatographie zu entfernen. Die besten Ergebnisse erzielten wir durch Chromatographie der Extrakte an Zellulose-Säulen und Methanol als Elutionsmittel. Die Elutionsbedingungen ließen sich so standardisieren, daß ein mühevoll-es Fraktionieren der Säuleneluate fortfiel und die anfallenden

glukosidhaltigen Fraktionen nach dem Einengen direkt zur Chromatographie verwendet werden konnten.

Im folgenden wurden die angereicherten und gereinigten Fraktionen des schwarzen Senfs (*Brassica nigra* L.), des weißen Senfs (*Sinapis alba* L.), des Meerrettichs (*Cochlearia armoracia* L.) und der Gartenkresse (*Lepidium sativum* L.) im Vergleich zu den entsprechenden Testsubstanzen untersucht. Beim schwarzen Senf, beim Meerrettich und bei dem Meerrettichpräparat BASAPEN^R läßt sich eindeutig das Sinigrin nachweisen. Das im Meerrettich vorhandene zweite Glukosid Gluconasturtiin, das vor kurzem von ISAAC und KOHLSTAEDT⁹⁵⁾ erstmalig papierchromatographisch aufgefunden wurde, konnten wir bisher noch nicht nachweisen. Im weißen Senf erscheinen drei deutlich ausgeprägte Flecke. Der oberste Fleck bei R_f 0.37 können wir nicht zuordnen. Der untere Fleck bei R_f 0.09, der im UV-Licht intensiv hellblau fluoresziert, kommt dem Sinapin zu. Kapuzinerkresse und Gartenkresse enthalten das Glukosid Glucotropaeolin, das auf dem Chromatogrammbild dem obersten Fleck bei R_f 0.48 entspricht. Für den darunterliegenden zweiten Fleck war eine Zuordnung noch nicht möglich (Abb. 45).

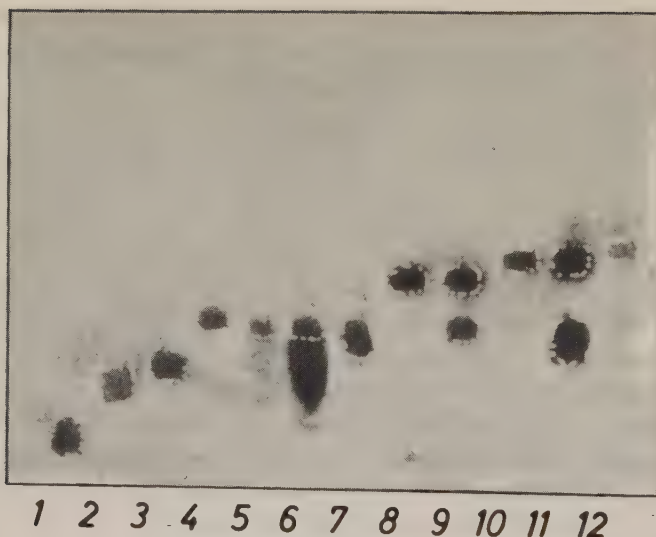


Abb. 45

Dünnschichtchromatographie von Senfölglykosiden

- | | |
|-------------------------|-------------------------------|
| 1 = Glucoiberin | 7 = Rasapen |
| 2 = Glucocheirolin | 8 = Sinalbin |
| 3 = Glucocapparin | 9 = Sinapis alba |
| 4 = Sinigrin | 10 = Glucotropaeolin |
| 5 = Brassica nigra | 11 = Tropaeolum majus |
| 6 = Cochlearia amoracia | 12 = Lepidium sativum (Kraut) |

Dünnschichtplatte: Kieselgel G Merck

Fließmittel: n-Butanol-n-Propanol-Eisessig-Wasser (3:1:1:1)

Sprühreagenz: Trichloressigsäure 25% in Chloroform + Kaliumferricyanid 1% + Fe-III-chlorid 5%

e) Chromatographie einer glukosidhaltigen Arzneispezialität

Wir untersuchten das Spezialpräparat RASAPEN^R, das das Glukosidgemisch des Meerrettichs enthält. Für die Durchführung der Chromatographie war es auch hier zweckmäßig, den aus den Dragees bereiteten methanolischen Auszug von den störenden Stoffen der Dragiermasse durch Chromatographie an Zellulose zu befreien. Wie schon vorher beschrieben, läßt sich das Glukosid Sinigrin gut nachweisen (Abb. 45, S. 143).

EXPERIMENTELLER TEIL

1. Untersuchung der freien Senföle

- a) Isolierung der Senföle aus Meerrettich und verschiedenen Arzneispezialitäten

Zur Herstellung des Meerrettichöls wurden 200 g zerkleinerte Meerrettichwurzeln mit 1 l Wasser versetzt und 2 Stunden stehen gelassen. Anschließend wurde das entstandene Öl mit Wasserdampf übergetrieben und 500 ml Destillat aufgefangen. Das Destillat wurde 2mal mit je 100 ml Petroläther (Sp. 30 - 50°C) ausgeschüttelt, die Petrolätherphase mit Natriumsulfat getrocknet und bei 20°C im Vakuum eingedampft. Aus BALSALYT- und TROMALYT-Salbe wurden etwa 5 g Salbe mit 50 ml Wasser versetzt und in einer Neo-Clevenger-Apparatur mit Wasserdampf destilliert. Man fing 20 ml Destillat auf und schüttelte 2mal mit je 10 ml Petroläther aus. Die Petrolätherphase wurde nach dem Trocknen mit Natriumsulfat im Vakuum eingedunstet. Von TROMAHALAT wurden 5 ml mit 10 ml Wasser verdünnt und vorsichtig 2mal mit je 10 ml Petroläther ausgeschüttelt. Auftretende Emulsionen wurden durch Zusatz von 1 - 2 ml Methanol zerstört. Die Petrolätherlösung wurde nach dem Trocknen im Vakuum eingedampft. Bei den Präparaten TROMACAPS und REDSKIN wurden die Senföle ohne vorherige Abtrennung direkt mit äthanolischem Ammoniak in die entsprechenden Thioharnstoffe überführt. Der Inhalt von 2 Kapseln TROMACAPS wurde mit einer Mischung von 1 ml 95%igem Äthanol und 1 ml 25%igem Ammoniak versetzt und 20 Min. erhitzt. Nach dem Erkalten wurde die überstehende klare Lösung vom ungelösten Emulgator abgossen und im Vakuum vorsichtig zur Trockene gebracht. Den Rückstand nahm man in 1 ml Äthanol auf und verwendete 0,02 ml dieser Lösung zur Chromatographie. In analoger Weise wurde REDSKIN (1 ml Ausgangsmenge) aufgearbeitet.

Zur Überführung der Isothiocyanate der übrigen Präparate in die Thioharnstoffe, versetzte man den Rückstand mit einer Mischung aus 1 ml 95%igem Äthanol und 1 ml 25%igem Ammoniak und erhitze 20 Min. auf dem Wasserbad. Anschließend dampfte man bis zur Trockene ein und nahm den Rückstand in 0.25 ml Äthanol auf. Davon wurden 0.003 ml zur Chromatographie verwendet.

b) Herstellung der Thioharnstoffe

Zur Herstellung kristalliner Thioharnstoffe aus dem Meerrettichöl und aus den Reinsubstanzen wurden 0.3 g Öl in 1 ml 95%igem Äthanol gelöst, dann die gleiche Menge 25%iger Ammoniak hinzugegeben. Das Gemisch wurde auf dem Wasserbad bis zum Einsetzen der exothermen Reaktion (etwa 20 Min.) erwärmt. Nach 12stündigem Stehenlassen wurde das Kristallinsat abgesaugt und, falls in der Literatur keine genauen Angaben gemacht wurden, mehrmals aus wässrigem Äthanol umkristallisiert und der Schmelzpunkt bestimmt.

Methylthioharnstoff wurde nach den Angaben von KJAER, GEELIN und LARSEN¹¹⁸⁾ aus Aceton umkristallisiert. Über die Schmelzpunkte von Äthyl- und Isopropylthioharnstoff sind in der Literatur widersprechende Angaben gemacht worden. HOFMANN¹¹⁹⁾ gab für Äthylthioharnstoff 113°C an, während DYSON¹²⁰⁾ 144°C fand. Wir kristallisierten aus Äthylacetat um und erhielten wie KJAER¹²¹⁾ einen Schmelzpunkt von 110 - 111°C. Bei Isopropylthioharnstoff beschrieb JAHN¹²²⁾ einen Schmelzpunkt von 157°C, während KJAER und CONTI¹²³⁾ durch Umkristallisieren aus Wasser 169 - 170°C fanden, was wir bestätigen konnten. Tabelle 21 gibt eine Zusammenstellung der Schmelzpunkte der zur Chromatographie verwendeten Thioharnstoffe.

T a b e l l e 21

Thioharnstoff	Schmelzpunkt
Methyl-	121°C (Aceton)
Äthyl-	110-111°C (Äthylacetat)
Isopropyl-	169-170°C (Wasser)
Allyl-	74°C (wässrig.Äthanol)
sec.n-Butyl-	137°C (wässrig.Äthanol)
β-Phenyläthyl-	137°C (wässrig.Äthanol)
Benzyl-	162°C (wässrig.Äthanol)
Phenyl-	153°C (wässrig.Äthanol)

c) Chromatographie der Thioharnstoffe

Als Adsorbens wurde Kieselgel G (Merck) oder Kieselgel GF₂₅₄ (Merck) verwendet. Für die Herstellung von 5 Kieselgelplatten wurden 25 g Kieselgel mit 50 ml Wasser zur Suspension angerieben und mit Hilfe eines Streichgerätes aufgetragen. Die Platten waren nach 2stündigem Trocknen bei Zimmertemperatur verwendbar. Das Dünnschichtchromatogramm konnte sofort ins Lösungsmittel gestellt werden, ohne eine Sättigung der Kammer abzuwarten. Als Lösungsmittel diente die Oberphase von Äthylacetat/Chloroform p.a./Wasser 3:3:4. Die Laufzeit betrug für eine Höhe von 15 cm 75 Min.. Die Thioharnstoffe wurden aus 0.1%iger äthanolischer Lösung in Mengen von 10 - 40 γ aufgetragen. Zum Nachweis diente eine 1%ige wässrige Lösung von Kaliumferricyanid und eine 5%ige wässrige Eisen-III-chlorid-Lösung. Die beiden Lösungen wurden kurz vor dem Besprühen jedesmal frisch zu gleichen Teilen gemischt.

Die Charakterisierung der auf fluoreszierenden Kieselgel-Schichten chromatographierten Thioharnstoffe erfolgte unter einer kurzwelligen UV-Lampe mit einem Maximum bei 254 mμ.

2. Untersuchung der Senfölglykoside

a) Herstellung der Glykosidlösungen

Zur Herstellung der glykosidhaltigen Lösungen wurden etwa 10 g der zerkleinerten Samen oder Wurzeln in 50 ml siedendes Methanol eingetragen, entsprechend der Technik von SCHULTZ und GMELIN¹¹⁴⁾ 5 Minuten gekocht und einige Stunden unter wiederholtem Umschütteln stehen gelassen. Etwa 50 g Gartenkresse brachte man unzerkleinert in 250 ml siedendes Methanol, kochte 5 Min. und ließ es 24 Stunden stehen. Das Filtrat wurde auf etwa 5 ml eingeeengt und auf eine mit 5 g Zellulosepulver (Cellulose MN 11 Macherey, Nagel u. Co., Düren) gefüllte Säule von 40 cm Höhe und 0.9 cm innerem Durchmesser aufgetragen und mit Methanol eluiert. Die ersten 20 ml Eluat wurden verworfen. Weitere 100 ml Eluat engten wir im Vakuum bei 20 - 30°C bis auf etwa 1 ml ein und trugen davon 0.01 - 0.2 ml auf.

b) Chromatographie der Glykoside

Die Chromatographie wurde auf nicht aktivierten Kieselgelschichten (siehe S. 147) mit dem Fließmittel n-Butanol/n-Propanol/Eisessig/Wasser 5:1:1:1 durchgeführt. Eine vorherige Kammersättigung war nicht notwendig. Die Laufhöhe betrug 15 cm bei einer Laufzeit von 180 Min.. Zur Charakterisierung der Flecken wurde mit 25%iger Trichloressigsäure in Chloroform kräftig besprüht, anschließend im Trockenschrank 10 Minuten lang bei 140°C erhitzt und schließlich mit einer Mischung aus gleichen Teilen einer 1%igen wässrigen Kaliumferricyanidlösung und einer 5%igen wässrigen Eisen-III-chloridlösung behandelt. Die Glykosid-Reinsubstanzen wurden als 0.2%ige Lösungen in Mengen von 20 - 40 γ aufgetragen.

3. Herstellung der Testsubstanzen

Isopropyl- und sec. n-Butylsenföl wurden nach dem von HOFMANN¹²⁴⁾ entdeckten Verfahren aus den entsprechenden primären Aminen und Schwefelkohlenstoff und Entschwefeln des entstandenen dithiocarbamidsauren Salzes mit Quecksilber-II-chlorid dargestellt.

Benzylsenföl erhielten wir nach den Angaben von HOFMANN¹²⁵⁾. Dabei wurden Benzylamin und Schwefelkohlenstoff in einer Mischung von Äthanol und Kaliumhydroxid gekocht und das entstandene Kaliumsalz der Dithiobenzylcarbaminsäure durch Behandeln mit Sublimat in das Senföl übergeführt.

Methyl-, Äthyl-, Allyl- und Phenylsenföl wurden von Fa. Fluka AG, Buchs (Schweiz) bezogen, β -Phenyläthylsenföl von Fa. Dr. Theodor Schuchardt, München. Sie wiesen gaschromatographisch*) geringe Verunreinigungen (1 - 5%) auf. Sämtliche Senföglukoside stammten von Fa. Carl Roth, Karlsruhe. Sie waren dünn-schichtchromatographisch einheitlich.

*) Die gaschromatographische Überprüfung der Senföle erfolgte nach den Angaben von KJAER und JART¹¹⁷⁾.

L I T E R A T U R

- 1) H.WINCKLER, Pharmaz.Zbl. 781 (1837)
- 2) G.IGOLEN, Rev.Marques-Parfums France 16, 111 (1938)
- 3) HAARMANN und REIMER, D.R.P. 149603; Chem.Zbl.I.975 (1904)
- 4) K.BRÜCKNER in E.Gildemeister/Fr.Hoffmann, Die Ätherischen Öle, Bd. VI, Akademie-Verlag, Berlin 1961
- 5) E.STAHL u. L.TRENNHEUSER, Arch.Pharmaz. 293, 826 (1960)
- 6) E.BAYER, Gaschromatographie, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1959
- 7) A.LIBERTI u. G.P.CARTONI in Gas Chromatography 1958, D.H. Desty, London 1958
- 8) A.B.THOMPSON, Australian J.Sci.Res. 4, 180 (1951)
- 9) F.MICHEEL u. H.SCHWEPPE, Angew.Chem. 66, 136 (1954)
- 10) B.M.CRAIG u. N.L.MURTY, Canad.J.Chem. 36, 1297 (1958)
- 11) J.G.KIRCHNER, A.N.PRATER u. A.J.HAAGEN-SMIT, Ind.Engng.Chem. analyt.Edit. 18, 31 (1946)
- 12) N.L.DRAKE u. J.BRONITSKY, J.Amer.chem.Soc. 52, 3715 (1930)
- 13) J.M.MILLER u. J.G.KIRCHNER, Analytic.Chem. 25, 1107 (1953)
- 14) R.PARIS u. M.GODON, Recherches 13, 48 (1963)
- 15) B.De VRIES, Fette, Seifen, Anstrichmittel 65, 725 (1963)
- 16) G.URBACH, J.Chromatogr. 12, 196 (1963)
- 17) J.G.KIRCHNER u. J.M.MILLER, Perfum.Record 43, 185 (1952)
- 18) J.G.KIRCHNER u. J.M.MILLER, Ind.Engng.Chem. 44, 318 (1952)
- 19) USA-Patent 27122008 (1955)
- 20) J.M.MILLER u. G.J.KELLER, Analytic.Chem. 23, 420 (1951)
- 21) W.SCHLENK jr., Angew.Chem. 61, 447 (1949)
- 22) F.WOLF, Riechstoffe u. Aromen 10, 33, 69 (1960)
- 23) M.H.KLOUWEN u. E.TER HEIDE, J.Chromatogr. 7, 297 (1962)
- 24) T.REICHSTEIN in E.Abderhalden, Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden Abt. 5, Teil 3B, 2.Hälfte, S.1407, Verlag Urban und Schwarzenberg, Berlin-Wien 1938
- 25) A.BUTENANDT u. U.WESTPHAL, Ber.dtsch.chem.Ges. 67, 2085 (1934)
- 26) O.WINTERSTEINER u. J.J.PFIFFNER, J.biol.Chem. 109c, Scientific. Proc. XXIX (1935)
- 27) A.PETIT u. S.TALLARD, Ind.Parf. 75 (1948)
- 28) P.A.STADLER, Helv.chim.Acta 43, 1601 (1960)
- 29) A.GIRARD u. G.SANDULESCO, Helv.chim.Acta 19, 1095 (1936)
- 30) M.VISCONTINI u. J.MEIER, Helv.chim.Acta 32, 1773 (1950)
- 31) J.BARNETT u. J.O.MORRIS, Biochem.J. 40, 450 (1946)
- 32) C.L.TEITELBAUM, J.org.Chem. 23, 6046 (1958)
- 33) E.LEDERER u. G.NACHMIAS, Bull.Soc.Chim.(France) 400 (1949)
- 34) Y.R.NAVES, Helv.chim.Acta 41, 654 (1958)
- 35) D.A.FORSS, Nature (London) 173, 401 (1954)
- 36) A.PETIT u. S.TALLARD, Ind.Parfum. 75 (1948)
- 37) A.EINHORN, Liebigs Ann.Chem. 300, 136 (1898); ibid. 317, 190 (1901)
- 38) A.EINHORN u. K.ESCALES, Liebigs Ann.Chem. 317, 196, 201 (1901)
- 39) W.TREIBS u. H.RÜHNERT, Chem.Ber. 84, 433 (1951)
- 40) G.E.UTZINGER u. F.A.REGENASS, Helv.chim.Acta 37, 1901 (1954)
- 41) B.TOLLENS, Ber.dtsch.chem.Ges. 15, 1635 (1882)
- 42) H.WAHLBAUM u. A.ROSENTHAL, Journ.prakt.Chem. 124, 58 (1929)

- 43) F.ASINGER, Ber.dtsch.chem.Ges. 75, 657 (1942)
- 44) J.H.ROSS, Analytic.Chem. 25, 1288 (1953)
- 45) L.A.JONES, J.C.HOLMES u. R.B.SELIGMAN, Analytic.Chem. 28, 191 (1956)
- 46) F.A.BRAUDE u. E.R.H.JONES, J.chem.Soc. 498 (1945)
- 47) G.D.JOHNSON, J.Amer.chem.Soc. 75, 2720 (1953)
- 48) J.D.ROBERTS u. C.GREEN, Ind.Engng.Chem.analyt.Edit. 18, 335 (1946)
- 49) H.H.SZMANT u. J.H.PLANINSEK, J.Amer.chem.Soc. 72, 4042 (1950)
- 50) A.I.SCHEPARTZ u. B.F.DAUBERT, J.Amer.Oil Chemists'Soc. 70, 27, 367 (1950)
- 51) I.N.NASAROW, J.allg.Chem.(Russ) 27, 606 (1957); Chem.Zbl. 133, 3055 (1962)
- 52) C.D.HOGMAN, R.C.WEAST u. S.M.SELBY, Tables for Identification of Organic Compunds, Chemical Rubber Publishing Company, Ohio 72 (1960)
- 53) A.CAMPELL, Analyst 61, 392 (1936)
- 54) K.STEPHAN, J.prakt.Chem. II 60, 248 (1899)
- 55) L.RUZICKA u. M.STOLL, Helv.chim.Acta 6, 852 (1923)
- 56) F.ELZE, Riechstoffind. 3, 175 (1928)
- 57) L.G.RADCLIFFE u. E.CHADDERTON, Perfum Record. 17, 254, 352 (1926)
- 58) L.S.GLICHITCH u. Y.R.NAVES, Parfums de France 11, 235 (1933)
- 59) T.REICHSTEIN, Helv.chim.Acta 2, 802 (1926)
- 60) E.E.CLAVET u. A.L.MONTES, An.Asoc.quim.argent. 41, 99 (1953); C.A. 48, 4778 (1954)
- 61) M.KERSCHBAUM, Ber.dtsch.chem.Ges. 40, 1732 (1913)
- 62) KARSTEN-WEBER-STAHl, Lehrbuch der Pharmakognosie, Gustav-Fischer-Verlag, Stuttgart 1962
- 63) E.GILDEMEISTER/Fr.HOFFMANN, Die ätherischen Öle, Bd. VI, Akademie-Verlag, Berlin 1961
- 64) W.KARRER, Konstitution und Vorkommen der organischen Pflanzenstoffe, Birkhäuser-Verlag, Basel und Stuttgart 1958
- 65) F.FEIGL, Spot Tests II. Org.Applications, S.171, Elsevier Publ.Co, New York 1954
- 66) M.KERSCHBAUM, Ber.dtsch.chem.Ges. 60, 902 (1927)
- 67) F.BODROUX, C.R.hebd.Seances Acad.Sci. 138, 1427 (1904)
- 68) E.HECKER, Chem.Ber. 88, 1666 (1955)
- 69) E.S.AMIN u. E.HECKER, Chem.Ber. 89, 695 (1956)
- 70) A.BUTENANDT u. NGUYEN-DAND TAM, Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 308, 277 (1957)
- 71) A.BUTENANDT u. H.REMBOLD, Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 308, 284 (1957)
- 72) F.LYNEN, B.W.AGRANOFF, H.EGGERER, U.HENNING u. E.M.MÖSLEIN, Angew.Chem. 71, 657 (1959)
- 73) L.A.WITTING u. J.W.PORTER, Biochem.Biophys.Res.Comm. 1, 341 (1959)
- 74) R.KUHN u. H.ROTH, Ber.dtsch.chem.Ges. 66, 1274 (1933)
- 75) Y.R.NAVES, Helv.chim.Acta 32, 1801 (1949)
- 76) W.DOLL, Ber.Schimmel 1252/53, 128 (1952)
- 77) R.B.WOODWARD, J.Amer.chem.Soc. 63, 1123 (1941)
- 78) R.B.WOODWARD, J.Amer.chem.Soc. 64, 72, 76 (1942)
- 79) J.W.WHITE u. E.C.DRYDEN, Analyt.Chem. 20, 853 (1948)
- 80) W.DASLER u. C.D.BAUER, Ind.Engng.Chem.analyt.Edit. 18, 52 (1946)

- 81) TH.J.DE BOER u. H.J.BACKER, Recueil Trav.chim.Pays-Bas 73, 229 (1954)
- 82) M.GÜNZL-SCHUMACHER u. U.WICKER, Chem.Ber. 93, 974 (1960)
- 83) O.WALLACH, Liebigs.Ann.Chem. 275, 103 (1893)
- 84) E.VON RUDLOFF, Canad.J.Chem. 39, 1 (1961)
- 85) G.D.JOHNSON, J.Amer.chem.Soc. 73, 5888 (1951)
- 86) J.H.DHONT u. C.DE ROOY, Analyst 86, 74 (1960)
- 87) J.BORECKY u.J.GASPARIC, Collect.czechoslov.chem.Comm. 25, 1287 (1960)
- 88) W.J.HOULIHAN, J.LEVY u. J.MAYER, J.Amer.chem.Soc. 81, 4692 (1959)
- 89) G.VON REIS, F.SJOESTRAND, Skand.Arch.Physiol. 79, 139 (1938)
- 90) H.T.A.HAAS, A.KRAUSHAAR u. D.A.CORDUA, Arch.exp.Path.Pharmak. 209, 138 (1959)
- 91) H.GERHARD, Pharmaz.Zentralhalle 92, 165 (1953)
- 92) A.G.WINTER u. L.WILLEKE, Naturwissenschaften 38, 354, 457(1952)
- 93) H.STICKL, Dtsch.med.Wschr. 79, 1722 (1954)
- 94) W.D.GERMER, Dtsch.med.Wschr. 79, 1445 (1954)
- 95) O.ISAAC u. E.KOHLSTAEDT, Arch.Pharmaz. 295, 165 (1962)
- 96) TH.HALBEISEN, Arzneimittel-Forsch. 7, 321 (1957)
- 97) M.KIENHOLZ u. B.KEMKES, Arzneimittel-Forsch. 10, 917 (1960)
- 98) A.G.WINTER u. M.HORNBOSEL, Naturwissenschaften 40, 489 (1953)
- 99) A.G.WINTER, Madaus Jahresb. 7, 21 (1953)
- 100) E.SCHINDLER, H.ZIPP u. I.MARTH, Arzneimittel-Forsch. 10, 919 (1960)
- 101) W.MÖHWALD u. H.GALLENKEMPER, Med.Klin. 56, 394 (1961)
- 102) K.PAECH u. M.V.TRACEY, Moderne Methoden der Pflanzenanalyse Bd. IV, 689, Springer-Verlag 1955
- 103) MORVILLEZ u. R.MEESEMAECKER, J.Pharmac.Chim. 30, 236 (1924)
- 104) H.BÖHME, Pharmaz.Zentralhalle 87, 299 (1948)
- 105) H.WOJAHN, Pharmaz.Zentralhalle 91, 326 (1952)
- 106) V.DIRKS, Landw.Versuchsstationen 28, 174 (1883)
- 107) A.SCHLICHT, Zeitschr.f.öffentl.Chemie 9, 37 (1903)
- 108) W.FÜRST, Pharmaz.Zentralhalle 100, 71 (1961)
- 109) A.KJAER, J.CONTI u. I.LARSEN, Acta chem.Scand. 7, 1276 (1953)
- 110) O.-E.SCHULTZ u. R.GMELIN, Z.Naturforsch. 9b, 27 (1954)
- 111) A.KJAER u. K.RUBINSTEIN, Acta chem.Scand. 75, 28 (1953)
- 112) S.FISEL, F.MODREANU u. A.CARPOV, Nota 1.Studii si Cercetari St., Chim. (Fil.Iasi) 7, 19 (1956)
- 113) S.FISEL, F.MODREANU u. A.CARPOV, Nota 2.Studii si Cercetari St., Chim. (Fil.Iasi) 8, 277 (1957)
- 114) O.-E.SCHULTZ u. R.GMELIN, Z.Naturforsch. 7b, 500 (1952)
- 115) O.-E.SCHULTZ u. R.GMELIN, Z.Naturforsch. 8b, 151 (1953)
- 116) O.-E.SCHULTZ u. R.GMELIN, Z.Naturforsch. 11b, 73 (1956)
- 117) A.KJAER u. AA.JART, Acta chem.Scand. 11, 1423 (1957)
- 118) A.KJAER, R.GMELIN u. I.LARSEN, Acta chem.Scand. 9, 857 (1955)
- 119) A.W.HOFMANN, Ber.dtsch.chem.Ges. 18, 2788 (1885)
- 120) G.M.DYSON u. R.F.HUNTER, Rec.Trav.chim. 45, 421 (1926)
- 121) A.KJAER, Acta chem.Scand. 8, 699 (1954)
- 122) H.JAHN, Monatsh. 3, 168 (1882)
- 123) A.KJAER u. J.CONTI, Acta chem.Scand. 7, 1011 (1953)
- 124) A.W.HOFMANN, Ber.dtsch.chem.Ges. 1, 170 (1868)
- 125) A.W.HOFMANN, Ber.dtsch.chem.Ges. 1, 201 (1868)

L e b e n s l a u f

Am 4. März 1936 wurde ich Hugo Friedrich Emil Nufer als Sohn des Bankangestellten Karl Nufer und seiner Ehefrau Berta geb. Müller in Kempten/Allgäu geboren.

Nach Besuch von 4 Jahren Volksschule trat ich 1946 in die Oberrealschule Kempten ein und legte dort im Juni 1954 die Reifeprüfung ab.

Meine zweijährige Berufsausbildung als Apotheker-Praktikant erhielt ich in der Rosen-Apotheke in Kempten.

Im November 1956 nahm ich an der Universität Tübingen das Studium der Pharmazie auf und schloß dieses im Oktober 1959 mit dem pharmazeutischen Staatsexamen ab.

Anschließend war ich zehn Monate als Kandidat der Pharmazie in der St.Martin-Apotheke in Kaiserslautern beschäftigt.

Ich begann im November 1960 mit der Ausarbeitung der vorliegenden Dissertation unter Anleitung von Herrn Professor Dr. L. Hörhammer.

Seit 8. März 1963 bin ich mit Magdalena Gertrud Arnu aus Tholey/Saar verheiratet.

